

Université de Montréal

Effet de la buspirone sur le réflexe-H chez la souris adulte décérébrée spinale

Par Yann Develle

Département d'anatomie. Université du Québec à Trois-Rivières

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

En Sciences Biomédicales

Mai, 2017

© Yann Develle, 2017

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

Résumé

La locomotion est générée par un réseau neuronal semi-autonome de la moelle épinière sous l'influence du contrôle supraspinal et des afférences périphériques. Aussi lors d'une lésion de la moelle épinière la perte de stimulation par les voies descendantes rend le réseau locomoteur silencieux. La sérotonine (5HT) étant un neurotransmetteur d'origine supraspinale essentiel à la locomotion, son utilisation chez les rongeurs facilite la réexpression de ce circuit neuronale et la récupération des fonctions motrices suite à une lésion spinale chez le rongeur. Cet effet est accompagné d'une réorganisation neuronale qui devrait être visible au niveau des réponses réflexes. Notre objectif consiste donc à observer la modulation du réflexe induite par l'utilisation de buspirone, un agoniste partiel 5HT_{1A} favorable à la réexpression de la locomotion chez la souris spinale adulte. Un modèle de souris décérébrée non anesthésiée a été développé afin de mesurer la modification de l'excitabilité du réflexe-H par la buspirone suite à une lésion spinale complète sur une durée de 60 minutes postinjection. La comparaison d'un groupe (N=8) traité à la buspirone (8mg/kg) à un groupe contrôle (N=6) montre une diminution significative (69%) du réflexe tôt après l'injection suivi d'une augmentation significative (170%) après 30 minutes. Cette hyperréflexie demeure caractérisée par un niveau d'inhibition postactivation similaire à la condition pré-dose. Ces résultats nous permettent d'associer une diminution du réflexe lors de la période prolocomotrice observée tôt après l'injection de buspirone. Ceux-ci sous-tendent également un rôle de la buspirone dans le contrôle sensorimoteur.

Mots-clés : Sérotonine (5-HT), récupération motrice, contrôle du réflexe, réflexe monosynaptique.

Abstract

Locomotion is generated by a spinal network which is, under normal conditions, modulated by supraspinal inputs and peripheral feedback. A spinal cord injury induces a loss of descending command and silence the locomotor network. Nevertheless, reexpression of this network can be facilitated by application of serotonin, a neurotransmitter originating supraspinally known to help locomotor recovery in spinal rodents. Such effect is associated with neuronal rearrangement which could be observed on reflex pathway. The aim of our study is to measure reflex modulation induced by buspirone, a 5-HT_{1A} partial agonist that allowed reexpression of locomotion in adult spinal mice. Using a newly developed model of decerebrated unanesthetized mouse we measure the modulation of H-reflex excitability induced by buspirone after an acute spinal transection for 60 minutes post-injection. Comparison between buspirone (8mg/kg) treated (N=8) and control (N=6) groups present a significant decrease in reflex amplitude (69%) at early stages of pharmacological treatment followed by a raise (170%) that become significant 30 minutes postdose. Those results allowed us to associate reflex decrease during prolocomotor period observed in first minutes after buspirone injection. There also support the involvement of buspirone in sensorimotor control.

Key-words : Serotonin (5-HT), motor function recovery, reflex control, monosynaptic reflex.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures	vii
Liste des sigles et abréviations	viii
Remerciements.....	x
Chapitre 1 : Introduction	1
1. Mise en contexte	1
2. Le mouvement locomoteur	2
A. Un mouvement rythmique	2
B. Un générateur spinal du rythme locomoteur.....	3
3. Interaction sensorimotrice	4
A. Participation des afférences dans la locomotion	4
B. Adaptation du réseau réflexe à la locomotion	6
4. Régulation du système sensorimoteur	7
A. Influence des voies descendantes	7
B. La sérotonine comme médiateur	10
5. Rôle des différents récepteurs sérotoninergiques	11
A. 5HT ₂	11
B. 5-HT ₇	13
C. 5-HT _{1A}	13
6. Effet d'une perte du contrôle supra-spinal sur le réseau	16
A. Dérégulation du système sensorimoteur	16
B. Maladaptation du système sensorimoteur	18
7. Stratégie de récupération d'un réseau locomoteur fonctionnel.....	20
A. Effet de l'entraînement.....	20
B. Utilisation d'un traitement sérotoninergique	20
8. Modèle d'étude	21
A. Détermination du modèle animal.....	21
B. Le réflexe-H.....	23

C. Stratégie d'anesthésie	30
Problématique	35
Chapitre 2 : Article	36
1. Abstract.....	38
2. INTRODUCTION.....	39
3. METHODS.....	41
A. Animal care and ethics.....	41
B. Anesthesia.....	41
C. Spinalization.....	41
D. Decerebration	42
E. H-reflex recording.....	43
F. Buspirone administration	43
G. Data acquisition and analysis.....	44
4. RESULTS	45
A. H-reflex in acute spinal decerebrated mice.....	45
B. Buspirone effect on the H-reflex	45
C. FDD of the H-reflex	46
5. DISCUSSION	47
A. Buspirone act as a 5HT _{1A} receptor agonist on the monosynaptic reflex.....	47
B. Opposite effect of 5HT _{1A} according to receptor location on the motoneuron.....	49
C. Biphasic effect of 5HT _{1A} receptors over time	50
D. Reflex inhibition and locomotion	50
6. Figure Legends	52
7. References	56
Chapitre 3 : Discussion et conclusion	65
1. Action prolocomotrice des récepteurs 5-HT _{1A} en périphérie du générateur de rythme	66
2. Rôle de l'inhibition du réflexe dans l'expression de la locomotion.....	66
3. Participation de l'excitation du réseau dans le maintien des fonctions locomotrices	67
4. Renversement de l'effet de la buspirone sur le réflexe au cours du temps.....	69
5. Conclusion.....	70
Bibliographie	I

Liste des figures

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1 : Circuit du réflexe-H

Figure 2 : Sites de modulation du réflexe-H

Figure 3 : Variation de l'amplitude du réflexe-H après injection de kétamine-xylazine

Chapitre 2 : Article

Figure 1 : Raw traces of recorded signals and representative recruitment curve

Figure 2 : Effect of buspirone on the H-reflex

Figure 3 : Reflex inhibition at 5Hz and 10Hz

Figure 4 : Schematic depiction of the H-reflex control system

Liste des sigles et abréviations

CPG: Central Pattern Generator, générateur central du patron locomoteur.

E1: extension 1.

E2: extension 2.

E3: extension 3.

F : flexion.

PAD : Primary Afferent Depolarization, dépolarisation des afférences primaires.

PIC : Persistent Inward Current, courant entrant persistant.

EMG : Electromyographie

Anatomie

C : segment cervicale

L : segment lombaire

T : segment thoracique

MLR: Mesencephalic Locomotor Region, region locomotrice du mésencéphale.

Pharmacologie

5-HT: 5-Hydroxytryptamine, sérotonine.

8-OHDPAT: 8-Hydroxy-2-DI-n-Propylamino-Tetraline.

GABA: Gamma-Aminobutyric-Acid, acide gamma-aminobutyrique.

H: réponse réflexe.

i.p : intrapéritonéale

KCC2: K-Cl- Cotransporteur 2.

M: réponse motrice.

NKCC1: Na-K-Cl- Cotransporteur 1.

NMDA: N-Méthyl-D-Aspartate.

TASK-1: acid-sensitiv-K-1.

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier mon directeur de recherche Hugues Leblond de m'avoir accueilli dans son laboratoire et donné ainsi cette opportunité formidable d'intégrer la recherche en neurophysiologie. Merci de cette confiance que tu m'as accordée en me permettant de réaliser mon projet de maîtrise dans la plus grande autonomie. Une expérience des plus professionnalisante que tu as su encadrer de ta rigueur et ta patience pour me guider dans ce cheminement.

Je remercie également Mathieu Piché de m'avoir permis d'utiliser ses installations et rendu possible la réalisation de ce projet. Par ailleurs tes conseils judicieux et remarques m'ont été d'une aide précieuse.

Une mention spéciale à Renaud Jeffrey-Gauthier qui a été présent dès le début et m'a permis de vivre pleinement cette expérience. Ton implication en recherche a été un modèle pour moi.

Je salue vivement mes très estimés collègues du 3470 et du CogNAC qui par leur joie de vivre, leur soutien ont rendu ces années mémorables.

Enfin je remercie mes parents pour leur support infailible et les nombreuses corrections apportées à ce mémoire. Ceci est pour vous.

Chapitre 1 : Introduction

1. Mise en contexte

La locomotion est un mouvement rythmique semi-autonome. Ceci signifie que la séquence d'activité musculaire peut être générée de manière autonome par un réseau neuronal de la moelle épinière lombaire. L'activité de ce générateur de patron locomoteur spinal demeure néanmoins modulable par l'action des afférences sensorielles en vue d'accommoder le mouvement à l'environnement. Cet ensemble forme ainsi le système sensorimoteur sur lequel s'exerce le contrôle des voies supra-spinales permettant l'adaptation du patron au besoin de l'individu. Cette organisation autorise donc théoriquement la possibilité d'évoquer un mouvement de type locomoteur des membres inférieurs suite à une section de la moelle épinière rostrale à la section lombaire. Cependant la perte de stimulation des voies descendantes notamment via le système sérotoninergique entraîne une réorganisation inadéquate du système sensorimoteur empêchant l'expression de la locomotion. En vue de permettre la réhabilitation de ce réseau neuronal, il est possible de reproduire la stimulation du système sérotoninergique par l'utilisation de la pharmacologie. Récemment notre laboratoire a démontré qu'un traitement par la buspirone permet la réexpression d'un réseau locomoteur fonctionnel chez des souris spinales (Jeffrey-Gauthier et al., 2014). Cette molécule permet donc un changement de l'excitabilité du système sensorimoteur vers un état favorable à la locomotion.

Le but de mes travaux consiste donc à comprendre quels changements de l'état d'excitabilité du système sensorimoteur sont associés à l'effet prolocomoteur de la buspirone. Ce circuit demeure néanmoins trop vaste pour être étudié dans son ensemble. L'observation de la voie réflexe permet toutefois d'observer les modulations apportées à la fois à l'information sensorielle et motrice et offre ainsi une estimation de l'excitabilité du réseau. L'utilisation d'un tel outil sous sa forme la plus simplifiée, le réflexe H, permet ainsi d'observer la

modulation du système sensorimoteur induite par la buspirone pouvant participer à l'effet prolocomoteur observé.

En vue d'être en mesure d'interpréter les mécanismes physiologiques mesurés, il est avant tout essentiel de décrire la nature des communications entre le réseau locomoteur et le système sensoriel ainsi que le contrôle des voies supra-spinales telle que la voie sérotoninergique.

2. Le mouvement locomoteur

A. Un mouvement rythmique

La possibilité de se déplacer est un élément fondamental à la survie des animaux. Dans cet optique, différents types de locomotion ont été développés incluant la marche, le vol, la nage... Un aspect inhérent à l'ensemble de ces stratégies est la répétition rythmique d'un même mouvement (Kandel et al., 2000). Cette vision stéréotypée est issue en partie de l'étude de la cinématique des pattes postérieures du chien pendant la marche au début du 20^e siècle. Par l'analyse de clichés photographiques, Philippon (Philippon, 1905) décrit quatre phases distinctes correspondant chacune à une activité musculaire spécifique lors d'un cycle locomoteur, soit la période entre deux contacts successifs du pied sur le support. Dans un premier temps, la flexion de la hanche, du genou et de la cheville permet l'élévation du membre. Cette première phase de flexion (F) est terminée par l'extension des articulations tibio-fémorales et tibio-tarsiennes tandis que l'articulation coxo-fémorale poursuit son mouvement vers l'avant (E1). Par la suite le contact avec le sol initie l'extension de l'articulation coxo-fémorale accompagnée d'une brève flexion des deux autres articulations (E2) du membre qui se change rapidement en extension (E3). De ces observations on distingue donc deux périodes fondamentales. La première, le balancement, principalement caractérisé par une flexion de la hanche permettant la progression du membre vers l'avant. La seconde, l'appui, durant lequel la hanche se déploie et permet la propulsion de l'animal. La description du cycle locomoteur a ainsi permis de mettre en évidence la production d'une séquence

d'activation musculaire spécifique coordonnant les différentes articulations du membre dans la production de la locomotion.

B. Un générateur spinal du rythme locomoteur

A cette même époque, des études réalisées sur des chiens (Freusberg, 1874) et des chats (Sherrington, 1899) avaient déjà permis d'observer des mouvements de type locomoteur des membres postérieurs suivant une transsection de la moelle épinière. La comparaison des patrons locomoteurs obtenus chez un animal spinal et intact a ensuite vérifié l'existence d'une similarité dans la production du mouvement (Engberg, 1964, Engberg and Lundberg, 1969). Ceci indique que la production de l'activité musculaire de la marche ne nécessite pas l'intervention des voies supra-spinales.

Par ailleurs Sherrington montra également que des séquences d'activité de type locomotrice pouvaient être évoquées par des stimulations d'ordre extéroceptif suggérant la participation des réflexes dans la production de la locomotion. Il en vint donc à proposer une théorie d'enchaînement de réflexes selon laquelle l'alternance de réflexes de flexion et d'extension croisée sur le membre controlatéral était capable de générer le mouvement observé lors de la marche (Sherrington, 1910a). Dans le but de confirmer cette théorie une étude fut réalisée sur un chat spinal ayant subi une rhizotomie des racines dorsales (Brown, 1911). Ainsi l'information des afférences sensorielles n'est plus en mesure de stimuler la contraction réflexe. Toutefois des épisodes d'alternance entre fléchisseurs et extenseurs ont tout de même pu être observés sur un tel modèle suggérant davantage un système central de génération du patron (CPG) locomoteur.

Ce type de réseaux capables de générer une activité rythmique est également impliqué dans d'autres fonctions caractérisées par la répétition d'un patron musculaire comme la mastication (Nakamura and Katakura, 1995) ou la respiration (Suzue, 1984). Dans le cadre de ce mémoire, le terme CPG demeure cependant spécifiquement associé au CPG locomoteur. Ce réseau

présente une composante phylogénétique très conservée au cours de l'évolution (MacKay-Lyons, 2002, Katz, 2015). Le CPG est donc présent chez toutes les espèces vertébrées et invertébrées (Grillner, 1985, Lydic, 1989) incluant l'humain (Dimitrijevic et al., 1998). En dépit de la grande variété de mouvements locomoteurs disponibles, l'organisation du réseau demeure comparable d'une espèce à l'autre.

3. Interaction sensorimotrice

A. Participation des afférences dans la locomotion

Si le CPG est capable de générer le rythme locomoteur à lui seul, la participation des afférences dans l'activité de ce réseau a déjà été suggéré par les travaux de Sherrington chez le chat (Sherrington, 1910a). D'autres études utilisant des animaux entraînés à marcher sur tapis roulant ont montré qu'ils sont capables d'adapter leur vitesse à celle imposée par le défilement de la surface malgré une lésion complète de la moelle épinière (Forssberg et al., 1980a, Forssberg et al., 1980b). Autrement dit, la stimulation des afférences par l'effet d'entraînement du membre est en mesure de modifier le rythme généré par le CPG. La détection de l'environnement et de la position du corps est essentielle à l'adaptation des comportements moteurs. L'intégration de ces informations extéro et interoceptives est assurée par les afférences en provenance des récepteurs sensoriels de la peau et des muscles. Dans le cadre de ce projet nous nous intéresserons principalement aux afférences musculaires de type proprioceptif. L'activation de ces fibres donne lieu à une réponse motrice stéréotypée générée par le système nerveux central, un réflexe qui participe à l'élaboration du mouvement.

Le muscle présente des structures appelées fuseaux musculaires contenant des terminaisons nerveuses sensibles à l'allongement du muscle. Les informations concernant la vitesse et le degré d'étirement sont relayées par les afférences Ia. Leur activation induit une contraction du muscle cible par un recrutement direct du motoneurone. Cette boucle sensorimotrice formée

d'une seule synapse constitue le réflexe monosynaptique d'étirement. L'activation de ces fibres sensorielles favorise également le déplacement articulaire par l'inhibition de muscles antagonistes. Cette facilitation s'effectue via l'activation des interneurons Ia dont le rôle consiste également à réduire l'inhibition réciproque en provenance des antagonistes (Hultborn et al., 1971). Il n'est pas encore clairement établi si ce réseau fait partie intégrante ou non du CPG mais il est actif lors de la locomotion (Degtyarenko et al., 1998, Burke et al., 2001) et facilite ainsi la coordination entre les fléchisseurs et extenseurs dans la production du mouvement (Hultborn et al., 1987, Guertin et al., 1995). Par ailleurs, les afférences Ia contactent également les motoneurons par une voie oligosynaptique permettant ainsi d'ajuster leur excitabilité (Quevedo et al., 2000). Cette stimulation serait responsable de 30 à 70% des potentiels excitateurs vers les extenseurs (Hiebert and Pearson, 1999).

Au niveau des organes tendineux de Golgi se trouvent les afférences Ib qui avec les Ia forment les afférences dites « primaires ». Ces fibres sont activées par la tension du tendon soit la charge exercée sur l'articulation. Lors de la locomotion, leur activation prolongée pendant la phase d'appui bloque l'initiation du mouvement de flexion et maintient l'extension (Duysens and Pearson, 1980). Par leur activité pro extenseur, les afférences Ib sont donc responsables de signaler la perte du contact avec le sol lors de la propulsion et ainsi d'optimiser l'efficacité de la marche.

Les afférences « secondaires » se retrouvent également au niveau des fuseaux musculaires. Ils sont activés par le degré d'allongement du muscle uniquement. Contrairement aux Ia, ces fibres sont non adaptables et continuent donc à réagir à l'étirement en absence de changement de la longueur du muscle. Cette mesure indirecte de l'ouverture articulaire est une information essentielle à l'optimisation de la transition de phase. Le degré d'extension de la hanche est particulièrement impliqué dans l'expression de la locomotion (Rossignol, 2006). L'ouverture de cette articulation permet de promouvoir le déclenchement de la locomotion, tandis que sa fermeture inhibe le rythme du membre ipsilatéral (Sherrington, 1910b).

B. Adaptation du réseau réflexe à la locomotion

Les afférences sont donc en mesure d'agir en synergie avec le CPG dans la production du mouvement locomoteur. Toutefois, à l'état de repos, la stimulation de ces afférences entraîne des réponses différentes voir opposées à celles observées lors de la locomotion. Dans ce sens, l'activité de la voie oligosynaptique des afférences Ia très marquée en période d'activité du CPG n'est pas ou peu présente lors du recrutement de ces fibres au repos (Gosgnach et al., 2000). D'autres perturbations du système réflexe ont également pu être mises en évidence lors de locomotion fictive par le renversement de la réponse motrice évoquée par les afférences Ib. Chez un animal au repos, la stimulation de ces fibres induit une inhibition du muscle associé. En revanche, une stimulation à un seuil et une zone comparable lors d'un épisode de locomotion facilite la contraction chez les extenseurs (Eccles et al., 1957, Lundberg et al., 1977, 1978, Jankowska et al., 1981, Conway et al., 1987, Gossard et al., 1994, Leblond, 2000). Un renversement du réflexe est également observé lors de l'activation des afférences du groupe II dépendamment de l'activité du CPG (Perreault et al., 1995, Stecina et al., 2005). Ces résultats pourraient être expliqués par la présence de plusieurs populations neuronales dont l'excitabilité serait tâche dépendante (Perreault et al., 1995, McCrea, 2001). L'existence d'un mécanisme de régulation des afférences apparaît donc nécessaire à la synchronisation des réponses réflexes et de l'activité du CPG.

En effet, la multitude de réflexes évoqués lors de la marche peut imposer des contraintes importantes sur le rythme. L'initiation constante de réflexes non coordonnés avec le patron locomoteur s'avère alors contreproductif (Perreault et al., 1999). Lors de la marche près de 800 000 décharges sensorielles sont émises par seconde en réaction aux déplacements articulaires et pressions environnementales, pouvant évoquer chacune des réponses motrices différentes (Prochazka and Gorassini, 1998). Afin de permettre l'expression de la locomotion, il devient donc nécessaire d'être en mesure de réprimer certaines informations sensorielles en vue notamment de réduire l'affluence de potentiels au niveau des motoneurones et faciliter le mouvement (Rowell and Shepherd, 1996, Gosgnach et al., 2000, McCrea, 2001). Cette théorie s'appuie entre autre sur les observations de Grillner et Shik (Grillner and Shik, 1973) chez le

chat décérébré dévoilant une dépression généralisée du réflexe de flexion peu avant l'initiation de la locomotion jusqu'à la fin de l'activité motrice. Le décalage entre l'initiation de cette inhibition et le mouvement indique une réorganisation du système sensorimoteur en préparation d'un épisode locomoteur et non induit par celui-ci. Ce décalage serait en partie lié à une diminution des potentiels excitateurs des afférences du groupe I au niveau des motoneurones lors de la marche (Gosgnach et al., 2000, Ménard et al., 2003). L'enregistrement des potentiels de champs présente également une inhibition marquée pour les groupes I et II en période de locomotion (Dueñas and Rudomin, 1988, Noga et al., 1995, Perreault et al., 1999). La transmission synaptique entre les afférences et les motoneurones est donc réduite, suggérant l'intervention d'un réseau d'interneurones exerçant une inhibition tonique au niveau présynaptique (Gosgnach et al., 2000).

L'induction de la locomotion n'est donc pas dépendante uniquement de la capacité d'activation du réseau locomoteur mais également de la participation de l'environnement neuronal (voir (Rossignol et al., 2005)). Le système sensorimoteur doit nécessairement être réorganisé en vue de permettre l'expression de la locomotion. Il existe donc un mécanisme de contrôle du système sensorimoteur favorisant la synchronisation des informations sensorielles avec le mouvement.

4. Régulation du système sensorimoteur

A. Influence des voies descendantes

La mise en place du mécanisme de contrôle des afférences est affecté par la perte de l'influence des voies descendantes suite à une transsection de la moelle épinière (Perreault et al., 1995). Les structures supra-spinales jouent donc un rôle essentiel dans la formation de cette réorganisation neuronale propre à la locomotion.

Depuis les années 1960, un groupe de chercheurs russes (Shik et al., 1966) a pu identifier une région du mésencéphale capable d'initier la locomotion (MLR). Le patron évoqué par la stimulation de la MLR induit une alternance des fléchisseurs et extenseurs coordonnée au sein du même membre et avec leurs homologues contralatéraux, assimilable à la marche. De plus par l'ajustement de l'intensité de la stimulation il est possible de modifier la vitesse du rythme locomoteur. Comme mentionné précédemment, la stimulation de la MLR induit une dépression généralisée du réflexe qui précède l'initiation du rythme et se maintient tout au long de son expression (Grillner and Shik, 1973, Noga et al., 1995). Ceci implique une participation des voies supra-spinales dans le contrôle des circuits réflexes lors de la locomotion.

Le signal émis par la MLR n'est toutefois pas directement transmis à la moelle épinière, mais transite dans un premier temps par le tronc cérébral. Cette zone comprend bon nombre de structures impliquées dans la production de mouvement. Parmi celles-ci, le noyau rouge semble particulièrement impliqué dans l'activité prolocomotrice de la MLR. Par une série d'expériences, Hongo, Jankowska et Lundberg ont pu mettre en évidence la voie de modulation du réflexe induit par les afférences du groupe I suite à l'activation de la MLR et du noyau rouge (Hongo et al., 1969). Cette structure communique avec les différentes sections de la moelle épinière via la voie rubrospinale dans le funicule latéral (Kandel et al., 2000). Son activation induit la production de dépolarisation des afférences primaires (PAD) se propageant dans le sens antidromique (Hongo et al., 1972a). Ces potentiels bloquent la propagation normale des dépolarisations des afférences. De surcroît, ils sont également impliqués dans l'inactivation des mécanorécepteurs du muscle (Rudomin, 1990, Rudomin and Schmidt, 1999). Ces phénomènes induisent donc une réduction de l'excitabilité du réflexe au niveau des afférences. Cette inhibition présynaptique est médiée via la relâche de GABA_A par l'intermédiaire d'un réseau interneuronal de la corne dorsale (Hongo et al., 1972a, b, Harrison and Jankowska, 1985, Rossignol, 2006).

Une modification de l'excitabilité des motoneurones est également observée durant l'activation de la voie rubrospinale. Cette interaction de type polysynaptique ferait également intervenir les interneurons Ia (Hongo et al., 1969). La capacité des afférences à dépolariser le motoneurone est un mécanisme fondamental de la réaction réflexe. Aussi existe-t-il des

circuits de type oligosynaptique permettant aux afférences de moduler le potentiel membranaire des motoneurones. Or cette voie se trouve également perturbée par la stimulation des voies descendantes et notamment rubrospinale, ce qui constitue un mécanisme de modulation postsynaptique (Hongo et al., 1969, Quevedo et al., 2000).

Si la voie rubrospinale semble au cœur de la régulation du système sensorimoteur par la MLR, l'importance de son effet dans la régulation du réflexe et l'initiation de la locomotion demeure néanmoins critiquée. D'autres voies permettant une régulation du réflexe plus marquée seraient activées suite à la stimulation de la MLR (Baldissera et al., 1972, Armstrong, 1986, Rossignol, 2006). Il est prouvé que la voie réticulospinale est particulièrement active lors de l'induction de la locomotion par MLR (Ito et al., 1970, Gonzalez et al., 1993). L'activation de cette voie par une stimulation des noyaux cunéiforme et tegmental pédonculopontique de la MLR est en mesure de moduler le tonus musculaire ainsi que l'activité rythmique des membres inférieurs (voir Takakusaki et al., 2016). Par ailleurs il a été démontré que le signal de la MLR transite par la formation réticulée à l'origine de cette voie (Noga et al., 2003). Cette structure comprend notamment les noyaux du raphé qui sont les principales sources de sérotonines du système nerveux (Yoshimura and Furue, 2006). De surcroît, l'interruption de la voie réticulospinale (Schreiner et al., 1949, Engberg et al., 1968) ou l'interruption de la relâche de sérotonine (Jordan et al., 2008) génère des modifications importantes du réflexe. Il est donc vraisemblable de penser que la sérotonine possède un rôle central dans le contrôle du réseau sensorimoteur lors de la locomotion. D'autres monoamines présentent aussi un rôle dans l'expression du réseau locomoteur comme la noradrénaline utilisée chez le chat (Forssberg and Grillner, 1973, Goldberg and Robertson, 1983, Barbeau and Rossignol, 1987, Barbeau and Rossignol, 1991, Hammar et al., 2002), ou encore la dopamine (Jankowska et al., 1967) qui semble avoir un effet particulièrement marqué chez la souris (Madriaga et al., 2004, Gordon and Whelan, 2006b, Han et al., 2007, Ung et al., 2012). Toutefois, seul l'effet de la sérotonine sera discuté ici.

B. La sérotonine comme médiateur

Le rôle central de la sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) dans le contrôle du réseau sensorimoteur lors de la locomotion est soutenue par le fait que la stimulation de structures pro-locomotrices comme la MLR ou le tronc cérébral induit une activation de neurones capables de relâcher ce neurotransmetteur au niveau spinal (Fyda et al., 1997, Noga et al., 2003, Noga et al., 2004, Noga et al., 2009). Les fibres bulbospinales recrutées présentent alors une augmentation du métabolisme de la sérotonine (Bourgoin et al., 1980). La relâche de 5-HT dans le milieu est également augmentée (Hammond et al., 1985, Sorkin et al., 1993). La capacité de la MLR d'induire la locomotion semble donc médiée par la relâche de 5-HT.

Des essais réalisés chez des lapins paralysés sous légère anesthésie ont montré que l'injection intra veineuse de 5-HT est capable de générer des décharges rythmiques des motoneurones similaires à celles observées lors de la locomotion (Viala and Buser, 1969, 1971, 1974). Ce phénomène a pu être observé aussi bien chez des animaux intacts, spinaux et décérébrés. Toutefois il semble exister des différences interspécifiques étant donné que l'injection de sérotonine ne permet pas de déclencher la locomotion chez le chat. Il n'en demeure pas moins qu'un effet au niveau sensorimoteur est perceptible par une augmentation du tonus musculaire et l'amplitude de mouvement (Grillner and Shik, 1973, Barbeau and Rossignol, 1991). Plus récemment des préparations de moelle isolée de rats néonataux ont permis de montrer que le rythme évoqué par la sérotonine ou NMDA est inhibé complètement par l'ajout d'antagonistes sérotoninergiques (Cazalets et al., 1992, Maclean et al., 1998). Autrement dit, la 5-HT tient un rôle indispensable dans l'activation de réseaux responsables de la locomotion.

Toutefois, ce neurotransmetteur n'est pas capable à lui seul de déclencher une décharge des motoneurones (McCall and Aghajanian, 1979, White and Neuman, 1980). Il agit donc de façon indirecte pour favoriser l'activité neuronale en modifiant l'état du réseau sensorimoteur en vue de le rendre propice à l'expression de la locomotion.

5. Rôle des différents récepteurs sérotoninergiques

Il existe sept classes distinctes de récepteurs à la sérotonine pouvant elles-mêmes intégrer plusieurs sous classes (Hoyer et al., 1994). L'activation spécifique de ces récepteurs initie une cascade métabolique et une fonction qui lui est propre. De ce fait, la 5-HT présente des effets très contrastés sur l'excitabilité neuronale (Krnjević and Phillis, 1963, Roberts and Straughan, 1967, Anwyl, 1990). Dans le cadre du réseau locomoteur, on distingue principalement trois types de récepteurs répartis en deux catégories. D'une part les récepteurs excitateurs représentés par les classes 5-HT₂ et 5-HT₇ capable de déclencher ou faciliter le rythme et les inhibiteurs comme les 5-HT_{1A} qui ralentissent la fréquence des décharges du CPG (voir (Schmidt and Jordan, 2000)). L'action de ces récepteurs sur la locomotion est associée à des modifications de l'excitabilité du système sensorimoteur spécifique de chaque récepteur.

A. 5HT₂

L'amplitude du réflexe monosynaptique (voir section afférence) utilisé comme marqueur de l'excitabilité des circuits spinaux (Lee et al., 2005) est réduit par l'inactivation des sous récepteurs 5-HT₂ (Yomono et al., 1992). Au contraire l'utilisation d'agoniste 5-HT₂ accroît l'amplitude de la réponse (Nagano et al., 1988). Ces sous récepteurs sont donc impliqués dans l'excitation du système sensorimoteur (Hasegawa and Ono, 1996b, Miller et al., 1996). Selon la répartition de ces récepteurs dans la moelle épinière, il semble agir principalement au niveau des motoneurones dans la région ventrale (Noga et al., 2009). Une étude récente a permis de localiser des récepteurs 5-HT_{2A} au niveau des dendrites des motoneurones (Dantsuji et al., 2016). Leur rôle est de favoriser l'augmentation de la dépolarisation des motoneurones en réponse à une stimulation par la relâche de neurotransmetteurs excitateurs comme le glutamate. Autrement, l'excitabilité motoneuronale est perçue via l'augmentation de courants entrants persistants suite à la dépolarisation (PIC). Il s'agit de canaux cationiques activables à des seuils différents de ceux produisant le potentiel d'action et qui contribuent dans un premier

temps à une entrée plus massive d'ions positifs puis à un maintien des charges entrantes. Ceci a donc pour effet de permettre la décharge du motoneurone à des intensités de stimulation plus faibles et de maintenir la dépolarisation après la fin du potentiel excitateur (ElBasiouny et al., 2010). Ce phénomène stimulé par les récepteurs 5-HT_{2C} et 5-HT_{2B} contribue ainsi à accroître l'excitabilité du système moteur (Perrier and Hounsgaard, 2003, Harvey et al., 2006, Murray et al., 2011).

La facilitation de la décharge motoneuronale peut également être obtenue par une désinhibition. Le GABA est un neurotransmetteur très impliqué dans l'inhibition des circuits spinaux. Au niveau des motoneurones, son action dépend de l'équilibre ionique entre les milieux extra et intracellulaires régulé via les transporteurs des ions chlorures NKCC1 et KCC2 (Boulenguez et al., 2010, Côté et al., 2011, Bos et al., 2013, D'Amico et al., 2014). Les ions se déplacent contre le gradient de concentration vers le milieu le plus pauvre. En favorisant un déséquilibre en faveur des importeurs NKCC1, les récepteurs 5-HT_{2B/C} favorisent une augmentation de la concentration intracellulaire d'ions chlorure chargé négativement. Ainsi l'ouverture des canaux chlore par le GABA induit une sortie massive d'anions et la dépolarisation du neurone (Bos et al., 2013). Ce faisant ils permettent la désinhibition du circuit. À l'inverse, les 5-HT_{2A} sont impliqués dans la surexpression de l'exporteur KCC2 (Bos et al., 2013). L'activité de ces récepteurs est donc essentielle à la potentialisation de l'effet inhibiteur du GABA et nécessaire à la régulation du système sensorimoteur lors de tâche motrice. Globalement, les 5-HT₂ semblent présenter un effet plutôt excitateur sur le réseau réflexe comme le suggère les travaux d'Hasegawa et Ono (Hasegawa and Ono, 1996b) chez le rat adulte bien que des résultats contradictoires aient également été révélés sur un modèle néonatal (Yomono et al., 1992). Aussi, si l'absence de communication entre la moelle épinière lombaire et les structures supra-spinales n'influent pas sur l'action des 5-HT₂ sur le réflexe (Nagano et al., 1988), le niveau de maturité du système nerveux semble représenter un point critique dans l'établissement de l'effet sérotoninergique sur le réseau sensorimoteur.

B. 5-HT₇

De nouvelles investigations commencent à s'intéresser à la classe des 5-HT₇ (Cabaj et al., 2016). Ce récepteur semble particulièrement impliqué dans la locomotion puisque son inactivation via un antagoniste abolit le rythme et le tonus musculaire (Schmidt and Jordan, 2000, Dunbar et al., 2010). Néanmoins, la 5-HT₇ ne déclenche pas à elle seule la locomotion. Le blocage de ces récepteurs n'a pas d'effet sur l'excitabilité des motoneurones. La 5-HT₇ agirait donc davantage au niveau de la régulation des afférences comme le suggère sa forte présence au niveau des cornes dorsales (Pierce et al., 1996, Meuser et al., 2002, Doly et al., 2005). Une étude réalisée chez le rat néonatal suggère un rôle de facilitation de la transmission synaptique du signal sensoriel (Garraway and Hochman, 2001). Chez l'adulte, le blocage des récepteurs 5-HT₇ n'interrompt pas la coordination lors de l'évocation de rythme chez l'animal curarisé. En revanche celle-ci est perturbée dans le cadre d'une locomotion réelle impliquant la participation du réseau sensoriel. La 5-HT₇ permet donc une modulation du rôle des afférences dans la coordination (Cabaj et al., 2016).

C. 5-HT_{1A}

La stimulation de la MLR et la relâche de 5-HT au niveau spinal provoque une inhibition du réflexe de flexion (Grillner and Shik, 1973). Dans ces conditions, une dépression du signal sensoriel peut également être observée au niveau du réflexe monosynaptique (Garraway and Hochman, 2001). Or cet effet est réduit de façon dose dépendante par l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A}. De plus, l'effet inhibiteur de la 5-HT sur le réflexe peut être reproduit suite à l'administration de 8-OH-DPAT chez le rat adulte spinal et intact (Hasegawa and Ono, 1996a, Hasegawa and Ono, 1996b, Honda and Ono, 1999). Cette molécule est un agoniste partiel des récepteurs 5-HT_{1A}. Ces récepteurs seraient donc à l'origine de la dépression sensorielle observée lors de l'administration de 5-HT. Toutefois, le 8-OHDPAT est également un agoniste 5-HT₇ qui participent au contrôle du signal sensoriel

(Cabaj et al., 2016) et il n'est donc pas possible d'affirmer l'importance de la 5-HT_{1A} dans l'inhibition du réflexe (Hasegawa and Ono, 1996a). Ce faisant, une autre étude réalisée sur moelle isolée de rat néonatal rapporte aussi une inhibition du réflexe suite à l'ajout de buspirone dans le milieu (Yomono et al., 1992). Contrairement au 8-OHDPAT cet agoniste 5-HT_{1A} ne se fixe pas sur les récepteurs 5-HT₇ et appuie la thèse de l'implication des 5-HT_{1A} dans l'inhibition sensorimotrice.

Les variations notables au niveau de l'effet de la sérotonine, particulièrement lors de l'activation des récepteurs 5-HT₂, entre les préparations néonatales et matures restreignent la possibilité de transfert des résultats entre des modèles de maturité différente. En revanche, la forte densité des récepteurs 5-HT_{1A} dans les cornes dorsales suggère un rôle important dans la régulation des afférences (Daval et al., 1987, Laporte et al., 1996, Giroux et al., 1999, Noga et al., 2009, Otoshi et al., 2009). Cet effet présynaptique a également été suggéré par une étude d'Hasegawa et Ono (Hasegawa and Ono, 1996a). Cette expérience En stimulant la corne ventrale il est possible de générer d'activer directement les motoneurones et les afférences. Ainsi il est permis d'estimer l'excitabilité de ces populations neuronales de façon indépendante. Par ailleurs, une stimulation orthodromique des afférences au niveau de la corne dorsale Lors d'une injection d'un agoniste 5-HT_{1A}, l'amplitude de la réponse réflexe tardive est inhibée. Toutefois la stimulation de la corne ventrale traduisant un maintien de l'excitabilité motoneuronale. L'effet se situe donc en amont de la synapse et indique une réduction de la quantité de neurotransmetteurs libérés par les afférences. Le système GABAergique étant très impliqué dans l'inhibition présynaptique, sa participation dans ce mécanisme est donc fortement suggérée. De plus l'interaction entre les interneurones GABAergiques et les récepteurs 5-HT_{1A} au niveau de structures supra-spinales impliquées dans divers processus a été largement décrite (Levkovitz and Segal, 1997, Matsuyama et al., 1997, Sibille et al., 2000, Amargós-Bosch et al., 2004, Santana et al., 2004, Lladó-Pelfort et al., 2012).

Une étude d'enregistrement intracellulaire réalisée chez la grenouille a permis de démontrer une augmentation de l'activité inhibitrice d'un bain de GABA via la génération de PAD en présence d'un agoniste 5-HT_{1A} (Gharagozloo et al., 1990). Le neurone enregistré a ensuite été

isolé du réseau spinal par le blocage de la transmission synaptique au moyen de tétrodothine. Ainsi seuls les récepteurs localisés sur la cible peuvent être en mesure d'influencer le signal. Or le même traitement sérotoninergique appliqué dans cette nouvelle condition génère également une potentialisation des PAD. Les récepteurs 5-HT_{1A} sont donc présents directement sur les afférences. Leurs participations à l'inhibition des afférences ne s'effectuent donc pas par une stimulation de la relâche de GABA au niveau des interneurons mais par une potentialisation de l'effet inhibiteur au niveau des récepteurs. Le marquage des récepteurs 5-HT_{1A} a aussi permis de révéler leur présence au niveau des laminae VII, VIII et X (Giroux et al., 1999, Noga et al., 2009). Ces régions comprennent les neurones intervenant dans la coordination. Parmi ceux-ci on compte notamment les commissuraux dont l'activité régule la coordination entre les deux membres et les ipsilatéraux impliqués dans l'alternance entre les fléchisseurs et extenseurs (Gordon and Whelan, 2006a, Kiehn et al., 2010, Zhong et al., 2010, Kiehn, 2011). La 5-HT_{1A} pourrait jouer un rôle dans la coordination lors de la locomotion.

La sérotonine est capable également de moduler l'excitabilité motoneuronale. En tant que système effecteur dans la production du mouvement, la facilité du recrutement des motoneurons par les afférences est un facteur clé de la modulation du réflexe (Ziskind-Conhaim et al., 1993, Heckman et al., 2009). Dans ce sens, il a été démontré que les récepteurs 5-HT_{1A} sont présents sur la surface des motoneurons (Jackson and White, 1990, Penington and Kelly, 1990). L'effet excitateur de la sérotonine sur le motoneurone peut être reproduit par l'utilisation d'un agoniste 5HT_{1A} dont l'effet est contré par l'ajout d'un antagoniste spécifique. La médiation de l'excitabilité motoneuronale s'effectue via la modulation de TASK-1, un canal ionique permettant la sortie des ions potassiques en phase d'hyperpolarisation (Takahashi and Berger, 1990, Perrier et al., 2003). Lors d'une dépolarisation induite par l'ouverture des canaux sodiques le potentiel membranaire augmente avec l'entrée de cations. La récupération du potentiel de repos est médié dans un premier temps par une sortie massive des ions potassiques via les canaux TASK ainsi qu'une expulsion active des ions Na⁺. Ceci permet de ramener le potentiel membranaire à l'état de repos générant également une période d'hyperpolarisation durant laquelle le motoneurone devient plus difficilement activable. En bloquant les canaux TASK-1, la 5-HT_{1A} diminue l'amplitude du flux repolarisant et inhibe le phénomène d'hyperpolarisation contribuant ainsi à faciliter la décharge des motoneurons

(Talley et al., 1997, Grunnet et al., 2004, Santini and Porter, 2010). Cependant, lors du traitement sérotoninergique, un faible pourcentage des motoneurones a présenté une inhibition de leur activité (Perrier et al., 2003). A partir de cette observation d'autres études ont pu être réalisées mettant en évidence un effet des 5-HT_{1A} dépendant de la localisation du récepteur sur le motoneurone (Perrier and Cotel, 2008). L'effet décrit précédemment est produit par l'activation des récepteurs dendritiques. En outre, il existe également des récepteurs 5-HT_{1A} au niveau du cône axonique servant à contrôler la dépolarisation du segment initial (Cotel et al., 2013). Leur association aux canaux Nav permet d'inhiber l'entrée du flux sodique dépolarisant nécessaire à la génération du potentiel d'action axonique (Perrier et al., 2003, Perrier et al., 2013, Petersen et al., 2016). Ce faisant, la 5-HT_{1A} augmente le seuil de décharge des motoneurones. Ces récepteurs, plus éloignés des sites de relargage de sérotonine nécessite une concentration de neurotransmetteurs plus importante et sont donc activés lors d'activité motrice soutenue (Cotel et al., 2013, Montague et al., 2013). Ils ont principalement un rôle dans la réduction de la fréquence de décharge des motoneurones à l'origine de la fatigue musculaire au niveau central, un processus nécessaire à la protection de l'appareil locomoteur (Gandevia, 2001). Les 5-HT_{1A} présentent donc un rôle d'encadrement de l'excitabilité motoneuronale et de modulation des afférences (Perrier, 2013).

6. Effet d'une perte du contrôle supra-spinal sur le réseau

A. Dérégulation du système sensorimoteur

Le système sérotoninergique apparait donc comme un médiateur du système sensorimoteur participant au contrôle de la locomotion par les voies descendantes. Lors d'une blessure de la moelle épinière, les connections entre les structures supra-spinales et les réseaux spinaux sont détruites. Suite au trauma on assiste alors à un bouleversement majeur du système sensorimoteur nommé choc spinal. Ce phénomène est visible par une période d'aréflexie qui survient dans les premières minutes après le traumatisme. La durée et les symptômes dépendent de la sévérité du traumatisme ainsi que de l'espèce (Ditunno et al., 2004). L'origine

du syndrome observé demeure encore peu connue. Toutefois une hyperpolarisation des motoneurones a été enregistrée (Leis et al., 1996). Cette inhibition du système moteur peut être reproduite par un blocage des fibres descendantes par refroidissement, suggérant une perte de facilitation d'origine supra-spinale (Schadt and Barnes, 1980). Une seconde théorie basée sur une inhibition des récepteurs périphériques semble néanmoins plus plausible. En effet, si le réflexe d'étirement est considérablement diminué voir absent dans les premiers temps suivant la lésion, son analogue électrique le réflexe H demeure présent (Diamantopoulos and Olsen, 1967). Ce réflexe recrute directement les afférences par stimulation électrique et ne nécessite donc pas l'intermédiaire des mécanorécepteurs (Misiasek, 2003, Palmieri et al., 2004). L'inhibition du réflexe d'étirement lors du choc spinal dépend donc davantage d'une perte d'excitabilité des mécanorécepteurs des muscles que des motoneurones eux-mêmes. Cependant, ces capteurs sensoriels jouent un rôle essentiel dans le maintien du tonus musculaire et agissent donc également sur l'excitabilité motoneuronale.

Des perturbations du réseau spinal sont également observées au niveau des neurones hypoactifs. L'arborisation dendritique permettant la connexion inter-neuronale dégénère suite à un traumatisme important de la moelle épinière (Illis, 1967, Llewellyn-Smith and Weaver, 2001). Le nombre de synapses responsables de la communication neuronale diminue donc également. Cette dégénérescence du réseau neuronal traduit une perte de la neurostimulation et de facteur de croissance. Dans ce sens, la concentration globale de neurotransmetteurs comme la sérotonine est drastiquement diminuée dans la partie distale de la moelle épinière suite à une section midthoracique (Carlsson et al., 1963, Emson et al., 1986). Comme décrit précédemment, une grande partie de la 5-HT est produite par des structures supra-spinales comme les noyaux du raphé. La quantité résiduelle quasi négligeable de 5-HT dans la moelle épinière suite à une perte des voies descendantes (Andén et al., 1964) suggère qu'il n'existe pas ou peu de source intra-spinale de 5-HT (Nishikawa et al., 1983). Aussi l'absence de stimulation et de régulation du système sensorimoteur conduit à une profonde altération des facultés motrices.

B. Maladaptation du système sensorimoteur

Le système nerveux est un système plastique et est donc capable de s'adapter à l'environnement généré par un traumatisme. L'altération de la communication synaptique entraîne des changements au niveau moléculaire visant une sensibilité accrue du système. Cette seconde phase intervient plusieurs jours après la lésion chez l'humain (Ditunno et al., 2004) mais peut s'avérer plus précoce chez des animaux présentant un métabolisme plus rapide comme la souris. Cette étape de plasticité neuronale est accomplie via la diminution des protéines de réabsorption des neurotransmetteurs. Cette stratégie permet d'augmenter l'intensité de stimulation d'une relâche de neurotransmetteur. Une grande partie des adaptations protéiques est réalisée au niveau des récepteurs. Leur synthèse est accrue et ils sont davantage exprimés au niveau des membranes (Ehlers, 2003). Il a été démontré qu'une diminution de la quantité de 5-HT relâchée au niveau cortical induit une majoration de l'activité globale des récepteurs 5-HT₂ (Gurevich et al., 2002). Il est donc très probable qu'une réaction similaire puisse survenir dans la moelle épinière suite à une perte des voies descendantes. Différents procédés moléculaires permettent d'accroître la sensibilité de la cellule à une substance. La réduction de la spécificité du lien avec le ligand et la surexpression des récepteurs au niveau de la membrane font partie de ces mécanismes mais nécessitent la présence du ligand dans le milieu. Or dans le cas d'une lésion de la moelle épinière la perte des neurones sérotoninergiques réduit la présence de sérotonine intra-spinale à un taux négligeable. En absence de ce ligand, il est donc peu probable que des stratégies de sensibilisation du récepteur puissent présenter des effets significatifs au niveau de la plasticité spinale. En revanche, tous les récepteurs à la 5-HT sont couplés aux protéines G (Hoyer et al., 1994). La modification du site de fixation de cette protéine relais au récepteur peut faciliter l'activation de celle-ci en absence de ligand. Cette capacité de déclencher la chaîne métabolique associée au récepteur sans que celui-ci n'ait été activé est définie comme son activité constitutive. L'utilisation d'agoniste inverse bloquant la libération de la protéine G a permis de montrer une activité constitutive importante des 5-HT_{2B/C} dans les segments sous lésionnels (Fouad et al., 2010, Murray et al., 2010). Ce mécanisme est associé à une plus grande expression de l'isoforme INI suite à un traumatisme spinal (Murray et al., 2010). Cette

version du récepteur présente un degré d'activité constitutive 2 à 3 fois plus élevé que les formes traditionnelles (Berg et al., 2008). Il a été précédemment développé que les récepteurs 5-HT_{2C} et 5-HT_{2B} sont impliqués dans l'excitabilité motoneuronale par l'augmentation des PICs. A court terme, ce phénomène est bénéfique pour l'activation des motoneurones et l'expression du système sensorimoteur (Miller et al., 1996, ElBasiouny et al., 2010) mais contribue par la suite à la formation de contractions musculaires prolongées impliqué dans le phénomène de spasticité (Bennett et al., 1999, Bennett et al., 2001, Bennett et al., 2004, Li et al., 2004, ElBasiouny et al., 2010, Murray et al., 2011, D'Amico et al., 2014). L'activation des récepteurs 5-HT_{2B/C} favorise également une diminution de l'inhibition GABAergique en diminuant l'expression de KCC2 (Bos et al., 2013). Or les récepteurs 5-HT_{2B/C} ont une activité constitutive dix fois supérieure aux 5-HT_{2A} (Aloyo et al., 2009). Il se crée donc un déséquilibre en faveur de l'excitation du réseau sous l'effet des 5-HT_{2B/C}. L'hyperexcitabilité du réseau ainsi que la perte des systèmes régulateurs occasionnées entre autres par le bouleversement du système sérotoninergique induit une augmentation de la réponse motrice et une diminution de la coordination entre les réponses réflexes opposées (Li et al., 2004, ElBasiouny et al., 2010, Côté et al., 2011, Murray et al., 2011, D'Amico et al., 2014). Cet état spastique devient donc contreproductif dans l'évocation d'un comportement moteur complexe tel que la locomotion.

7. Stratégie de récupération d'un réseau locomoteur fonctionnel

A. Effet de l'entraînement

Néanmoins, l'état hyperréflexique qui apparaît chez les animaux spinaux chroniques peut être maîtrisé par l'entraînement des membres paralysés. La récupération du support de poids ainsi que des capacités d'expression du réseau locomoteur suite à l'application d'une telle méthode suggèrent la récupération d'un système sensorimoteur fonctionnel (Rossignol, 2006). Le retour des fonctions semble particulièrement associé à la promotion de l'efficacité de systèmes inhibiteurs (Adams and Hicks, 2005, Côté et al., 2011, Côté et al., 2014). Parallèlement à la réhabilitation du réseau spinal, une augmentation de l'expression des récepteurs 5-HT_{1A} est enregistrée (Otoshi et al., 2009). Une constatation similaire a préalablement été réalisée sur des chats spinaux entraînés (Giroux et al., 1999). Cependant, ce phénomène n'est visible que lorsque les afférences sont en mesure de stimuler les réseaux spinaux (Otoshi et al., 2009). Ces études supportent donc un parallèle entre la récupération des fonctions sensorimotrices et l'activité des 5-HT_{1A} sous l'influence du signal sensoriel. D'autres recherches montrent que la lamproie est capable de récupérer l'ensemble des fonctions locomotrices suite à une lésion de la moelle épinière. La surexpression des récepteurs 5-HT_{1A} observée suite à une lésion spinale serait probablement impliquée dans cette formidable capacité (Cornide-Petronio et al., 2014). Globalement, ces travaux soutiennent l'implication de la 5-HT_{1A} dans la récupération des fonctions sensorimotrices.

B. Utilisation d'un traitement sérotoninergique

À la lumière des résultats présentés ci-dessus concernant l'observation des réseaux spinaux suite à un traumatisme, il est possible de suggérer une participation majeure de la sérotonine dans la plasticité du système sensorimoteur. Ainsi l'application d'une pharmacologie ciblant

des récepteurs propres à ce neurotransmetteur semble indiquée en vue de faciliter la restauration des fonctions motrices.

Différents traitements basés sur une administration de sérotonine seule ou en combinaison avec d'autres traitements ont ainsi été proposés. Une amélioration significative des capacités de réexpression de locomotion après lésion de la moelle épinière a pu être observée chez le rongeur (Landry and Guertin, 2004, Antri et al., 2005, Ung et al., 2012). Plus récemment, l'utilisation de buspirone, un agoniste partiel des récepteurs 5-HT_{1A} (Loane and Politis, 2012), a démontré des propriétés pro locomotrice à la fois chez la souris (Jeffrey-Gauthier et al., 2014) et l'humain (Gerasimenko et al., 2015). Notre intérêt est donc de comprendre comment l'utilisation de cette molécule permet la récupération d'un circuit sensorimoteur propice à l'expression de la locomotion.

8. Modèle d'étude

A. Détermination du modèle animal

La compréhension de la neurorégulation représente un défi important, notamment lorsqu'il s'agit de localiser les différents sites d'action des neurotransmetteurs et l'implication des neurones cibles dans le circuit à l'étude (Sharples et al., 2014). L'utilisation récente d'outils génétiques a grandement facilité la description de l'organisation des réseaux neuronaux (Goulding, 2009). De façon similaire la pharmacogénétique autorise un contrôle plus ciblé de l'activation du système neuromodulateur (Shapiro et al., 2012, Aston-Jones and Deisseroth, 2013). Suite au séquençage du génome murin, il est désormais possible d'avoir accès à une vaste variété de souche de souris transgéniques permettant l'application de telles techniques. Ce faisant la souris est devenue un modèle largement en expansion dans le domaine de la locomotion. En revanche, il existe peu de données physiologiques basées sur la moelle épinière murine. Dans un souci de faciliter la comparaison des données fonctionnelles et

organisationnelles il est nécessaire de concentrer les recherches sur un même modèle. Notre projet s'insérant dans le cadre de la compréhension de la modulation pharmacologique des réseaux spinaux, l'utilisation de la souris comme modèle d'étude assure la transférabilité des données vers les modèles génétiques. De surcroît, la buspirone est capable d'induire la réexpression de la marche chez la souris. Il est donc possible de reproduire cette condition dans l'optique d'observer les modifications de l'excitabilité du réseau sensorimoteur induite par la pharmacologie. Par ailleurs, comme énoncé préalablement, l'effet de la sérotonine sur le réseau neuronal est très dépendant de la maturité de l'animal. L'objectif de cette étude est de comprendre les mécanismes permettant la réexpression du réseau locomoteur suite à la perte des voies descendante sous l'effet d'une stimulation sérotoninergique dans un système mature. Des souris adultes ont donc été utilisées.

La sérotonine possède des effets au niveau supra-spinal pouvant modifier la réponse du réseau spinal au traitement. En vue d'analyser uniquement l'effet du traitement sur les neurones de la moelle épinière il est donc nécessaire d'isoler les segments d'intérêt par une spinalisation. Du fait que notre étude s'intéresse à comprendre des mécanismes sous-jacents à la récupération motrice, il est nécessaire que le CPG demeure entier et que les neurones qui le compose ne soient pas détruits par la lésion. Des études réalisées sur des moelles isolées de rongeurs ont localisé le CPG dans la partie lombaire avec une prédominance des segments L1 et L2 dans la génération du rythme (Cazalets et al., 1995, Kjaerulff and Kiehn, 1996, Cowley and Schmidt, 1997, Kremer and Lev-Tov, 1997). La lésion doit donc être réalisée en amont de la jonction thoraco-lombaire. Il a été démontré qu'une souris est capable suite à un entraînement de réexprimer des mouvements locomoteurs du train arrière suite à une section complète de la moelle épinière au niveau mi thoracique (T8-T9) (Leblond et al., 2003). Aussi le même niveau de lésion a été utilisé dans cette étude. Dans les conditions aiguës comme ici où l'excitabilité du réseau spinal est mesurée environ 2 heures seulement après la lésion de la moelle épinière il est nécessaire de se prémunir contre un éventuel choc spinal. En vue de minimiser les dommages lors de la transsection une dose de lidocaïne est appliquée par diffusion avant la lésion. La destruction des neurones entraîne une libération massive localisée de neurotransmetteurs excitateurs. L'hyperactivation des récepteurs qui en résulte entraîne l'apoptose des cellules cibles propageant ainsi l'étendue de la lésion (Dong et al., 2009).

L'utilisation d'un bloqueur des canaux sodiques comme la lidocaine prévient la génération et le déplacement du potentiel d'action (Scholz, 2002) et s'oppose ainsi à ce phénomène d'excitotoxicité. Se faisant, il est donc possible de limiter l'effet de la lésion sur l'excitabilité du réseau spinal.

B. Le réflexe-H

Un système simplifié

Le réseau sensorimoteur est un ensemble extrêmement complexe dont la description des neurones qui le composent et leurs interconnexions demeurent encore très fragmentaires. Aussi est-il nécessaire d'utiliser un circuit plus restreint et mieux connu permettant néanmoins d'obtenir un aperçu de l'excitabilité de la moelle épinière et de l'état des mécanismes de régulation de l'activité neuronale. Le réflexe-H, originellement décrit par Hoffmann en 1910 (Hoffmann, 1910) est un analogue électrique du réflexe d'étirement. Cette réponse est normalement induite par l'activation de mécanorécepteurs du fuseau musculaire sensibles au degré d'étirement du muscle. Dans le cas du réflexe-H, la dépolarisation des fibres sensorielles est obtenue par une stimulation électrique d'un nerf et ne nécessite donc pas l'intervention des mécanorécepteurs (Schieppati, 1987). Ainsi la modulation de la réponse réflexe n'est pas dépendante de l'excitabilité du système périphérique et est moins affectée par un éventuel état de choc spinal. La décharge électrique induit une dépolarisation de l'ensemble des fibres contenues dans le nerf. Toutefois, la résistance des axones diminue de façon inversement proportionnelle à leur diamètre. Aussi les plus grosses fibres, comme les afférences Ia et les motoneurones alpha sont capables de décharger à des intensités plus basses que les autres fibres. Il est ainsi possible de sélectionner spécifiquement ces neurones impliqués dans le réflexe d'étirement.

Suite à l'activation du nerf, deux réponses peuvent être enregistrées par un suivi électromyographique (EMG) du muscle innervé. La plus rapide est une activation directe des fibres musculaires par les motoneurones. Cette réponse présente un délai de l'ordre d'1ms

chez la souris . Également appelée réponse motrice (M), cette décharge ne transite pas par la moelle épinière et présente alors une amplitude uniquement associée au nombre de fibres activées par la stimulation. Cette mesure peut donc être utilisée comme marqueur de répétabilité du processus de recrutement lors de la comparaison des réponses obtenues par plusieurs stimulations (Palmieri et al., 2004). Lors de l'application d'un courant au niveau de l'axone du motoneurone, la dépolarisation se déplace également vers le soma. Dans ce cas l'activation du segment initial génère un nouveau potentiel d'action. Cette activation indirecte du muscle appelée réponse F (Wang et al., 2011) peut chez la souris être confondue avec le réflexe-H (Akay, 2014).

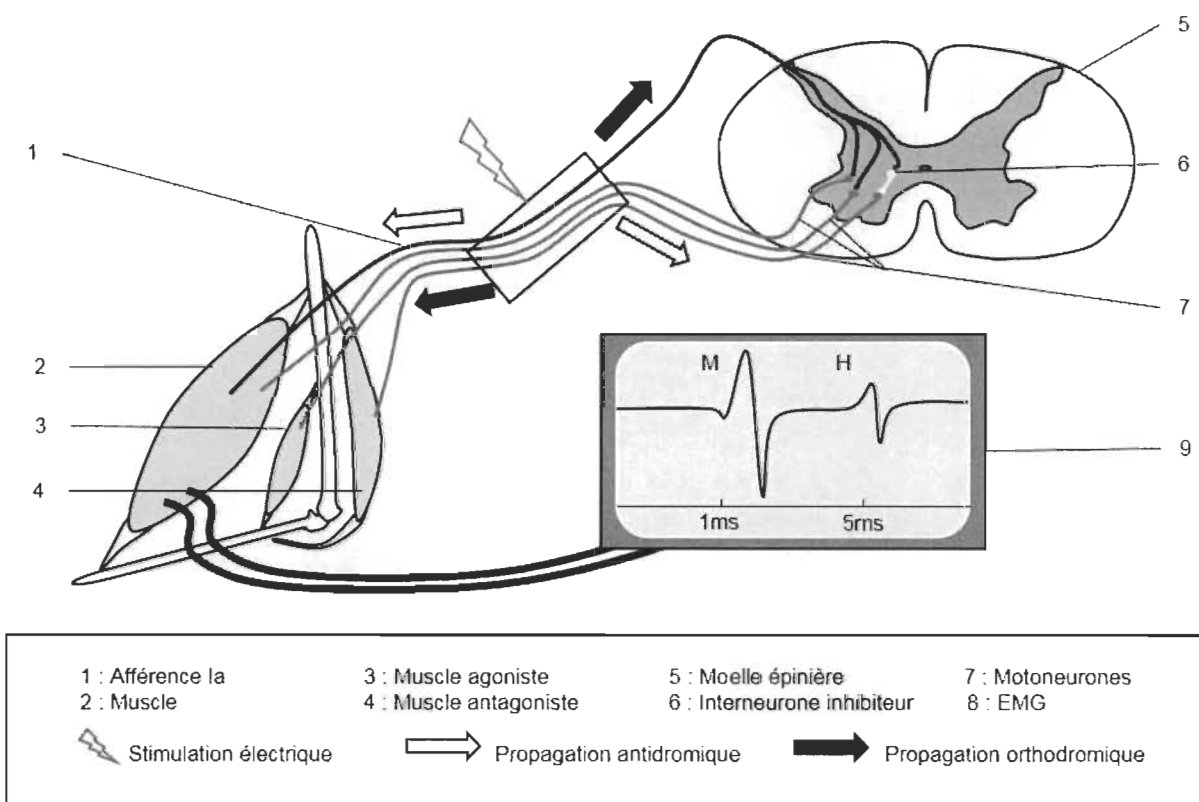


Figure 1 : Circuit du réflexe-H

La stimulation du nerf tibial permet le recrutement des afférences la et des motoneurones alpha. L'activation orthodromique des motoneurones induit une première réponse motrice indépendante de l'excitabilité spinale. La dépolarisation des afférences active de façon monosynaptique les motoneurones pour générer une réponse réflexe plus tardive.

Au niveau des afférences Ia, le potentiel d'action induit par la stimulation électrique se propage également dans le sens antidromique vers les mécanorécepteurs du muscle et orthodromique vers le réseau spinal. La dépolarisation orthodromique n'apparaît pas au niveau de l'EMG mais provoque une baisse de l'excitabilité des récepteurs sensoriels (Rudomin et al., 1993). Ce phénomène périphérique n'affecte pas la mesure du réflexe-H. La dépolarisation orthodromique des afférences Ia permet le recrutement de motoneurones qui induisent à leur tour la contraction du muscle. Cette réponse réflexe (H) visible au niveau de l'EMG a un délai dépendant de la distance entre la moelle épinière et le site d'enregistrement. Chez l'humain la réponse du soleus est visible 30ms poststimulation contre 15ms au niveau du vastus medialis (Palmieri et al., 2004), tandis que chez la souris, la contraction du gastrocnémius ou du soleus est obtenue après environ 4ms (Carp et al., 2006, Akay, 2014). En 1951, par l'analyse du délai de transmission de signal, Magladery et al (Magladery et al., 1951) ont suggéré une connexion de type monosynaptique entre les afférences Ia et les motoneurones. La boucle réflexe activée par la stimulation se compose donc d'une fibre sensorielle activant directement un ensemble de motoneurones, ce qui constitue un circuit sensorimoteur simplifié facilitant son étude. Du fait qu'il ne présente qu'une seule synapse, le réflexe-H est une mesure de la capacité des afférences à dépolariser les motoneurones cibles.

Une mesure de l'état du système sensorimoteur

La synapse est un organe de conversion du signal électrique en message chimique permettant la communication interneuronale (Kandel et al., 2000). L'arrivée d'un potentiel d'action axonique au niveau du bouton synaptique génère une dépolarisation de la membrane permettant l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants. Le flux de calcium entrant permet l'exocytose des vésicules de neurotransmetteurs et la libération de ces molécules effectrices dans la fente synaptique. L'intensité de la relâche de ces messagers est proportionnelle au flux calcique entrant. Or le degré et le temps d'ouverture des canaux ioniques sont soumis à l'influence des propriétés membranaires du neurone. Cette appellation

englobe l'ensemble des phénomènes régissant les échanges ioniques entre les milieux extra et intracellulaires. Cet état du neurone affecte donc aussi bien la probabilité de générer un potentiel d'action suite à une stimulation que l'amplitude du flux calcique au niveau synaptique. De ce fait, les propriétés membranaires du neurone présynaptique, dans le cas présent les afférences, sont directement impliquées dans la force du signal synaptique émis. Par ailleurs comme il a été développé précédemment, il existe une interrelation entre le réseau locomoteur et le système sensoriel permettant de moduler l'excitabilité des afférences. L'activité des réseaux inhibiteurs sur les afférences constitue donc également une voie de régulation du signal présynaptique (Figure 2.1). De la même manière, l'entrée du flux dépolarisant suite à l'activation des récepteurs postsynaptiques par les neurotransmetteurs est également sous l'influence des propriétés membranaires et la capacité d'ouverture des canaux ioniques (Figure 2.2). Les motoneurones qui représentent ici la cible postsynaptique constituent en outre une voie commune d'expression de nombreux circuits impliqués dans différentes tâches motrices. Aussi leur capacité de réponse au stimulus est modulée par l'activation de différents circuits dont le réseau locomoteur (Figure 2.3). L'ensemble de ces mécanismes postsynaptiques vont influencer la probabilité de générer un potentiel somatique. La sommation de ces stimuli dépolarisants permet ensuite l'activation du segment initial pour produire un potentiel d'action axonique afin de recruter la plaque motrice. La probabilité de génération du potentiel d'action est elle-même soumise à la capacité d'ouverture des canaux ionique du cône axonique (Figure 2.4). Il existe donc au moins quatre phénomènes impliqués dans la réponse réflexe évoquée.

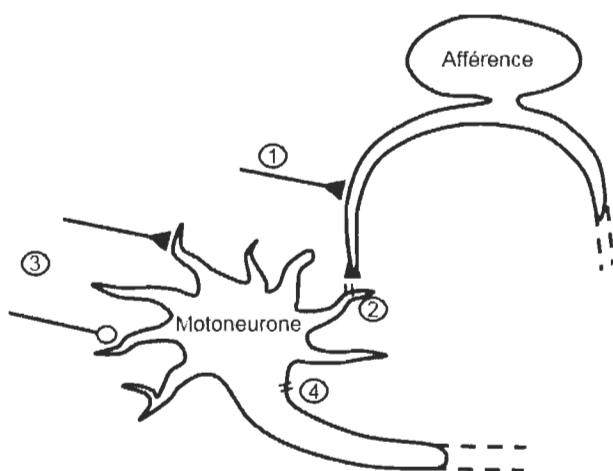


Figure 2 : Sites de modulation du réflexe-H.

Cet arc réflexe se constitue d'une afférence la contactant de façon monosynaptique un motoneurone homonyme. Dans un premier temps, la transmission synaptique peut être affectée par 1) l'inhibition présynaptique qui réduit la relâche de neurotransmetteur par les

afférences. Ensuite la génération du potentiel synaptique au niveau du motoneurone dépend 2) de l'activité des canaux ioniques postsynaptiques et 3) des influences inhibitrices et excitatrices sur les propriétés membranaires. Enfin 4) l'excitabilité du segment initial détermine la force de la réponse motrice émise.

Lors de l'évocation du réflexe-H, le but est d'induire une décharge stéréotypée des motoneurones suite à l'activation des afférences. Les variations observées pour une stimulation comparable suite au traitement reflètent alors un changement de l'excitabilité du circuit. Or ce changement d'état est généré par une action directe sur les neurones de la boucle réflexe ou de l'activation de réseaux modulateurs. Cette mesure est alors une estimation indirecte du niveau d'activité des réseaux spinaux. En ce sens cet outil autorise l'observation des différences d'états du système sensorimoteur suite au traitement sérotoninergique.

Le réflexe-H n'est toutefois pas uniquement monosynaptique (Misiaszek, 2003). La différence d'excitabilité entre les afférences Ia et Ib est faible et il est donc très probable que l'ensemble de ces fibres soit recruté lors de la stimulation. Les Ib contactent les motoneurones par un interneurone inhibiteur interposé. L'aspect disynaptique de cette connexion entraîne une réponse théoriquement plus délayée et ne devrait pas se confondre avec la mesure du réflexe-H. Par ailleurs l'utilisation de pulse de stimulation unique permet d'éviter une action prolongée des afférences Ib sur les motoneurones par le phénomène de sommation temporelle des potentiels. Dans le cas où le CPG serait actif, sans nécessairement présenter des décharges rythmiques, la voie inhibitrice des Ib est remplacée par une connexion de type polysynaptique présentant une activité excitatrice sur les motoneurones des extenseurs (Conway et al., 1987, Gossard et al., 1994, Leblond, 2000). Dans une mesure, la relâche de neuromodulateur par les voies descendantes joue un rôle essentiel dans l'excitabilité du réseau spinal, y compris au niveau des neurones impliqués dans le réflexe-H. Cette mesure est donc une observation globale des mécanismes de régulation du système réflexe.

En outre, l'activation des afférences Ia entraîne également la décharge de la voie oligosynaptique participant à la modulation de l'excitabilité des motoneurones. Cette voie est préférentiellement active lors des périodes de locomotion (Gosgnach et al., 2000) et constitue

donc un marqueur de réorganisation du système sensorimoteur. Or son action affecte le recrutement motoneuronal par les afférences et modifie donc l'amplitude de la réponse réflexe observée. Il est donc possible également d'observer des changements du réseau sensorimoteur propre à l'activation de réseau spécifique comme le réseau locomoteur.

La mesure de l'amplitude du réflexe-H semble donc convenir à l'étude des changements d'état du système sensorimoteur occasionnés par un traitement à la buspirone.

Si l'utilisation de drogue est en mesure d'induire des modifications du fonctionnement du réseau spinal, il devient nécessaire de savoir dans quelle mesure ce changement d'état affecte sa fonction.

Mesure fonctionnelle des modifications du système sensorimoteur par la buspirone

Le réflexe-H permet également d'obtenir une estimation du niveau de spasticité de l'animal suite à la lésion de la moelle épinière. Comme mentionné précédemment, un traumatisme neuronal entraîne une réorganisation du réseau conduisant à une hypersensibilisation du circuit. Cette situation d'hyperréflexie est associée en partie à une perte du contrôle inhibiteur. Au niveau des motoneurones, 80% des connexions sont réalisées avec des neurones inhibiteurs de type GABAergique ou glycernergique (Rodolfo et al., 2013). Le contrôle inhibiteur est donc un aspect essentiel de la production du mouvement. Lors d'une activité motrice comme la locomotion chez le rat néonatal, le blocage de circuit inhibiteur par la strychnine induit une synchronisation de la décharge musculaire (Cowley and Schmidt, 1995). La perte de l'alternance entre les muscles antagonistes s'oppose alors à la production d'un mouvement coordonné. Le réseau inhibiteur est donc essentiel à la coordination musculaire. Aussi en vue de vérifier la nature fonctionnelle de la stimulation sérotoninergique du réseau sensorimoteur par la buspirone, une seconde mesure axée sur le contrôle inhibiteur est également suggérée.

Le réflexe monosynaptique présente un mécanisme inhibiteur dépendant de la fréquence de stimulation (Curtis and Eccles, 1960). Aussi l'activation répétée de l'afférence génère une diminution de la réponse motrice évoquée, visible à partir de 1Hz et maximale à 5Hz. Chez les animaux spinaux chroniques, une réduction marquée de cette inhibition a été révélée et corrélée à l'hyperexcitabilité du réseau sensorimoteur (Thompson et al., 1992). Bien que ce mécanisme soit encore méconnu, une forte composante présynaptique est suggérée (Hultborn et al., 1996). L'activation des afférences Ia génère une réduction des potentiels excitateurs relâchés au niveau des synapses avec le motoneurone. Cette relâche de neurotransmetteurs moins importante traduit un phénomène présynaptique. Ce type d'inhibition est généralement médiée en partie par les récepteurs GABAergiques (Rudomin and Schmidt, 1999). Néanmoins aucun PAD n'est enregistré lors de cette autoinhibition excluant par le fait l'inhibition classique par GABA_A. Une hypothèse s'appuyant sur la synthèse de neurotransmetteurs a donc été avancée. La réserve neuronale de ces molécules est limitée et il est donc nécessaire de synthétiser de nouveaux stocks pour permettre des décharges répétées. Lorsque la fréquence de libération dépasse la vitesse de synthèse, la stimulation synaptique vers les neurones cibles se trouve alors réduite.

Si cette hypothèse permet l'explication de la diminution des potentiels synaptiques à hautes fréquences, elle ne permet pas de tenir compte de la potentialisation du signal lors d'un train de stimulation à une fréquence supérieure à 20Hz (Curtis and Eccles, 1960). Ce phénomène visible sur la deuxième réponse postactivation implique une inhibition tonique de l'afférence qui débute environ 50ms après la première décharge. Dans ce sens, l'augmentation de la concentration synaptique de GABA via le blocage de la réabsorption par la portion présynaptique ou l'utilisation de baclofène, un agoniste des sous récepteurs GABA_B, permet de potentialiser l'inhibition fréquence dépendante chez des rats spastiques (Kakinohana et al., 2006). Ce mécanisme de contrôle de décharge des afférences nécessite donc la participation du GABA principalement au niveau des récepteurs GABA_B. Ceux-ci ciblent les canaux calciques impliqués dans la capacité de relâche de neurotransmetteurs sans dépolarisation du neurone (Rodolfo et al., 2013). En outre, chez des rats intacts, la dépression fréquence dépendante du réflexe est réduite sous l'effet d'un antagoniste sélectif du GABA_A (Jolival et al., 2008). La participation de ce récepteur est donc également nécessaire. La bicuculline utilisée ici comme

antagoniste GABAergique bloque les récepteurs GABA_A à l'origine de la production de PAD et non ceux engagés dans l'inhibition continue (Rodolfo et al., 2013). L'implication de ces récepteurs semble néanmoins controversée par les observations préalables de Hultborn et collaborateurs (Hultborn et al., 1996) qui soulignent l'absence de PAD lors de l'inhibition postactivation. Toutefois, ce mécanisme demeure associé à l'activité GABAergique au niveau présynaptique (Lee-Kubli and Calcutt, 2014, Lee et al., 2014). Le niveau d'activité de ce rétrocontrôle est par ailleurs corrélé négativement avec la présence de spasticité (Schindler-Ivens and Shields, 2000, Kakinohana et al., 2006, Yang et al., 2015). Cette mesure représente donc une évaluation valide de l'inhibition GABAergique ainsi que de la capacité du réseau sensorimoteur à générer un mouvement complexe.

La mesure de l'amplitude du réflexe-H ainsi que l'un de ces mécanismes d'inhibition semblent donc adaptés à une observation globale de la modulation du système sensorimoteur occasionnée par un traitement à la buspirone. Toutefois d'autres circuits intervenant principalement dans la coordination participent à la modulation de cette réponse. L'activation d'autres muscles ou de récepteurs sensoriels modifient l'excitabilité du réseau en vue de faciliter le mouvement réflexe associé. Ainsi la phase d'un cycle de marche ou en absence de mouvement, la position du membre fait intervenir une activité neuronale qui lui est spécifique. De ce fait le réflexe-H est très sensible aux perturbations motrices et sensorielles (Slivko and Teteryatnik, 2005, Slivko and Bogutskaya, 2008). Il est donc nécessaire de maintenir une position fixe pendant toute la durée de l'expérience afin d'assurer une meilleure répétabilité entre les stimulations. Ceci permet d'éviter les perturbations phasiques et d'être en mesure d'associer les changements d'état du réseau à l'action du traitement. Également, par souci de reproductibilité, la position doit être identique d'un individu à l'autre, aussi le membre est maintenu en extension.

C. Stratégie d'anesthésie

Le maintien de l'animal en position fixe nécessite d'avoir recours à l'anesthésie. Cette méthode permet également de stimuler directement le nerf et faciliter ainsi le recrutement des

afférences primaire. En raison de la taille du modèle murin, l'emploi de la stimulation transcutanée utilisée pour l'évocation du réflexe chez l'humain accroît la possibilité de provoquer la contraction de muscles hétéronymes et perturber la lecture de la mesure. En revanche, du fait que le réflexe-H est une mesure de la communication neuronale, il est particulièrement sensible à l'utilisation d'anesthésie (Ho and Waite, 2002) dont le but est de bloquer la transmission du signal neuronal. Le circuit monosynaptique se distingue de la voie polysynaptique empruntée entre autre par le réflexe de flexion par l'utilisation de récepteur non NMDA dans la transmission du signal. Ainsi l'administration d'un antagoniste de ces récepteurs inhibe la production du réflexe de flexion sans affecter la réponse-H (Schwarz et al., 1994, Thilmann et al., 2012). Le réflexe monosynaptique emploie des récepteurs de type AMPA. Ce type de récepteurs non NMDA est impliqué dans la transmission synaptique rapide médiée par le glutamate (Thilmann et al., 2012). La kétamine-xylazine est un anesthésiant dissociatif qui bloque spécifiquement les canaux NMDA (Sleigh et al., 2014) et n'affecte donc pas le réflexe monosynaptique. Nonobstant son utilisation massive chez l'animal pour l'évocation du réflexe-H, des perturbations de la réponse H suite à l'injection de kétamine ont été rapportées (Buffenoir et al., 2013). Cette perturbation affecte notamment l'amplitude de la réponse ainsi que le délai. Or la sensibilité du réflexe à la modulation exercée par le réseau spinal est dépendant de son amplitude (Crone et al., 1990). Le recrutement du nerf est très variable d'un individu à l'autre. Aussi la comparaison de l'amplitude du réflexe nécessite la mise en place d'un système de normalisation. Le ratio H/M permet de mesurer la réponse réflexe (H) par rapport à l'ensemble de fibres activées lors de la stimulation (M) (Côté et al., 2011). Lorsque ce ratio dépasse 40% le circuit réflexe est hyperexcitable. Dans ces conditions il est peu affecté par une facilitation du fait que son amplitude est déjà maximale mais est très sensible à l'inhibition. À l'inverse lorsque le ratio est inférieur à 20%, le réflexe est réprimé et réagit peu à l'inhibition. En vue de s'affranchir de ces effets « plancher » et « plafond » il est nécessaire de pouvoir obtenir un ratio H/M compris entre 20 et 40%. Dans cet intervalle il est alors possible d'observer les différentes modulations exercées par le réseau spinal sur le réflexe.

Comparaison des modèles anesthésiés sous kétamine et non anesthésiés décérébrés pour l'évocation du réflexe-H

Lors de nos premières tentatives d'évocation du réflexe-H chez la souris, la réponse obtenue ne rencontrait pas les exigences d'amplitudes. Il est possible que la mesure de ce réflexe chez la souris soit très affectée par l'utilisation de la kétamine et ne permette pas l'étude de la stimulation sérotoninergique sur ce circuit. En vue de clarifier l'effet de l'anesthésie sur le réflexe un essai a été réalisé de manière à comparer la réponse H en présence et absence de kétamine. Comme mentionné précédemment l'évocation du réflexe ne peut être réalisée chez un animal conscient. Une technique permettant de retirer la conscience de l'animal sans recourir à une anesthésie chimique est la décérébration. Cette méthode décrite au début du XXe siècle par Sherrington chez le chat (Sherrington, 1910a) consiste à retirer mécaniquement les régions du cerveaux impliquées dans l'intégration et le traitements des informations sensorielles. Ceci permet de désensibiliser l'animal tout en minimisant ou s'affranchissant totalement de l'utilisation d'anesthésie chimique. Le niveau de décérébration peut être ajusté de la décortication à une préparation où seul le tronc cérébral est conservé en fonction des besoins de l'étude. Dans le cadre de l'étude de la kétamine sur le réflexe-H une décérébration haute suivant l'axe précolliculo-prémamillaire est privilégiée. La totalité du cortex ainsi que la majeure partie du thalamus sont retirées (Paxinos and Franklin, 2004). Les centres de traitement et de répartitions de l'information sensorielles sont donc détruits tout en préservant les structures plus profondes impliquées dans le maintien des fonctions vitales. Il est donc possible de retirer l'anesthésie et obtenir ainsi un système nerveux fonctionnel adapté à l'étude des réflexes (Nakanishi and Whelan, 2011, Dobson and Harris, 2012). En utilisant cette méthode décrite nouvellement par Meehan et Whelan (Meehan et al., 2017) nous avons été en mesure de comparer l'amplitude du réflexe-H chez une souris non anesthésiée décérébrée et spinalisée avant et après l'injection d'une dose de kétamine-xylazine (Fig 3). L'effet de l'anesthésiant sur le réflexe est alors observé toute les 10 minutes pour une durée de 40 minutes.

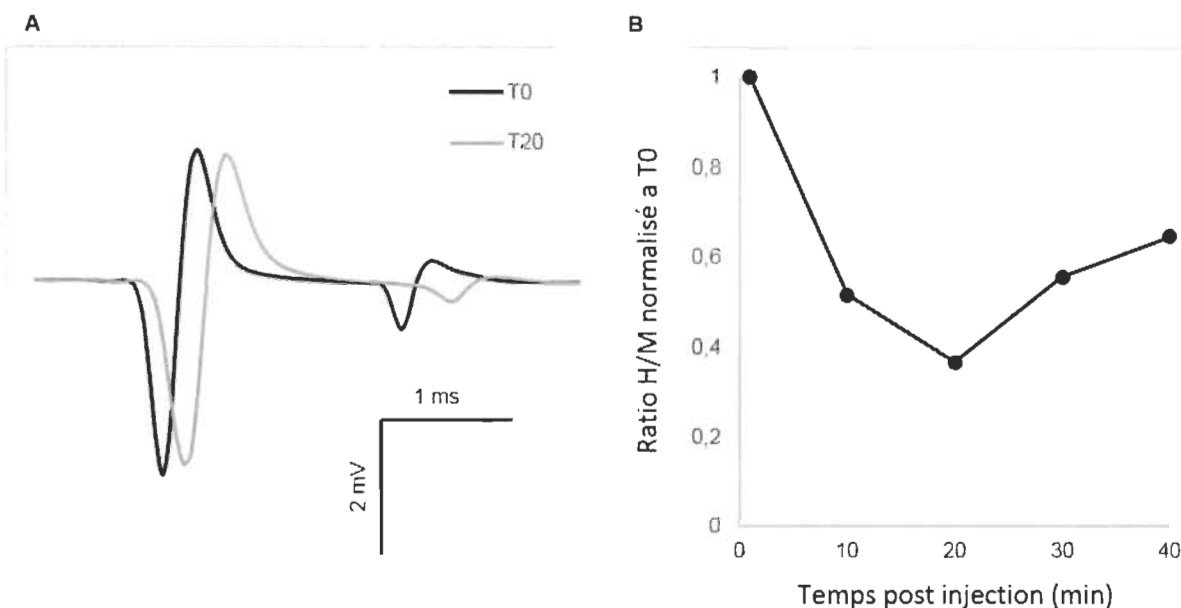


Figure 3 : Variation de l'amplitude du réflexe-H après injection de kétamine-xylazine

A) Signal moyenné de 30 stimulations immédiatement après l'injection et au pic d'inhibition à 20 minutes postdose. B) Évolution du ratio H/M au cours du temps après injection de kétamine-xylazine

Suite à l'injection on observe une réduction du ratio H/M de 63.6% à 20 minutes post dose qui tend à récupérer ensuite. L'effet observé est probablement associé au blocage des canaux sodiques par la kétamine (Hara et al., 1994, Guignard, 2006). La réduction du flux de sodium à travers la membrane occasionne une diminution du potentiel membranaire. Ensuite, lors de l'activation du segment initial, le blocage de l'entrée du flux sodique dépolarisant inhibe la vitesse de montée du potentiel d'action et réduit son amplitude. On observe alors une diminution de l'amplitude du réflexe. La réponse motrice en revanche est une activation directe du muscle et ne transite donc pas par le segment initial, d'où le maintien de son amplitude. De plus, la kétamine agit également sur le recaptage des catécholamines, dont les neurotransmetteurs dopamine et noradrénaline également impliqués dans la régulation du système sensorimoteur.

Par ailleurs comme décrit plus haut, le réflexe-H n'est pas purement monosynaptique et peut être influencé par d'autres circuits polysynaptiques ou oligosynaptiques. L'effet de sélectivité

de l'anesthésiant sur le circuit monosynaptique bloque la participation de ces circuits dans la réponse évoquée et est probablement impliqué dans la diminution de l'amplitude du réflexe. Par ailleurs, le but de notre étude consiste à comprendre les mécanismes de contrôle du système sensorimoteur. Or ceux-ci peuvent inclure des réseaux utilisant les récepteurs NMDA qui seraient altérés par l'anesthésie. L'utilisation de kétamine chez la souris ne semble donc pas convenir à l'étude du réflexe-H suite à un traitement sérotoninergique.

Choix de la préparation décérébrée

L'adaptation des comportements réflexes est nécessaire à l'expression de certains réseaux comme celui de la locomotion. Cette réorganisation du système sensorimoteur doit donc être synchronisée avec l'activité de ces circuits afin de garantir un fonctionnement optimal. Il existe donc un lien entre l'activité de réseaux spécifiques et l'état du système sensorimoteur. Il a été démontré que des circuits réflexes décrits chez des animaux anesthésiés utilisent des voies différentes lorsqu'étudiés chez des animaux décérébrés éveillés (McCrea, 2001). Certaines circuiteries dépendent de l'activité de réseaux spécifiques comme en phase de locomotion ou lors de l'utilisation de pharmacologie induisant la locomotion (Gossard et al., 1994, Perreault et al., 1995, Leblond, 2000). La décérébration permet de préserver l'activité du système nerveux et s'impose donc comme préparation de choix dans l'étude de phénomènes activité dépendants tels que la réorganisation des réseaux sensorimoteurs.

Problématique

Les récepteurs sérotoninergiques constituent une cible pharmacologique de choix dans la réorganisation du système sensorimoteur permettant une réhabilitation du CPG locomoteur après une lésion de la moelle épinière. Ces observations découlent notamment d'essais utilisant la buspirone, un agoniste partiel des 5-HT_{1A}, qui promeut la mise en place d'un milieu permissif au mouvement locomoteur. Le but de notre étude est donc d'étudier les modifications du système sensorimoteur facilitant l'expression de la marche suite à l'application de cette drogue. Sur des souris spinales aiguës et décérébrées, l'amplitude du réflexe-H est utilisée comme marqueur des modifications de l'excitabilité du réseau spinal. L'effet sur le contrôle inhibiteur témoignant de l'aspect fonctionnel de ces changements est ensuite mesuré grâce au comportement fréquence dépendant de cet arc réflexe.

Les résultats d'une étude parue récemment (D'Amico et al., 2016) sur le contrôle de l'excitabilité motoneuronale par la buspirone chez des sujets éveillés indiquent un effet dépressif du traitement sur la réponse motrice. Notre hypothèse est donc qu'un traitement à la buspirone induit une diminution de la réponse réflexe.

Chapitre 2 : Article

Auteurs : Yann Develle et Hugues Leblond

Titre : Effect of buspirone on H-reflex in acute spinal decerebrated mice

Article en préparation au moment de la rédaction du mémoire.

Contribution par auteur :

Yann Develle :

Développement de la méthode

Collecte des données

Analyse des résultats

Rédaction de l'article

Hugues Leblond :

Conception de l'étude

Rédaction de l'article

Effect of buspirone on the H-reflex in acute spinal decerebrated mice

Yann Develle and Hugues Leblond*

Department of Anatomy and CogNAC Research Group, Université du Québec à Trois-Rivières (UQTR), 3351 Boul. des Forges, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

Running title: Buspirone effect on the H-reflex

Table of content category: Neuroscience – behavioral/systems/cognitive

***Corresponding author:**

Hugues Leblond, PhD

Department of Anatomy

CogNAC Research Group

UQTR

3351 boul. des Forges, C.P. 500

Trois-Rivières, QC, Canada G9A 5H7

Telephone: 819-376-5011 Extension 3306

E-mail: hugues.leblond@uqtr.ca

1. Abstract

Pharmacological treatment facilitating locomotor expression also modulates reflex expression through the re-arrangement of spinal networks. Buspirone, a partial serotonin receptor agonist (5-HT_{1A}), was recently shown to facilitate and even trigger locomotor movements in mice after complete spinal lesion (Tx). Here, we studied its effect on the H-reflex after acute Tx in adult mice. To avoid possible impacts of anesthetics on H-reflex depression, experiments were performed in un-anesthetized mice (N=13) after decerebration. The H-reflex in plantar muscles of the hind-paw was recorded after tibial nerve stimulation with bipolar hook electrode 2 h after Tx at the 8th thoracic vertebrae level. Average H/M ratio (30 stimulations at 0.2 Hz) was compared before and every 10 min after buspirone administration (8 mg/kg, i.p.) for 60 min. Frequency-dependent depression (FDD) of the H-reflex was assessed before and 50 min after buspirone treatment by comparing H-reflex amplitude at 0.2, 5 and 10 Hz. Before buspirone, the H-reflex could be elicited in acute spinal mice with H/M ratio averaging between 10 to 30%. FDD of the H-reflex was observed at 5 Hz (68%) and 10 Hz (70%) relative to 0.2 Hz. After buspirone, the H/M ratio was initially decreased, presenting values around 69% of pre-treatment. It then increased significantly 30 to 60 min after exposure to buspirone, reaching 170% of pre-treatment values 60 min after injection. FDD was also measured 50 min after buspirone at 5 Hz (81.2%) and 10 Hz (84.9%). Two-way ANOVA discerned no significant impact of treatment on FDD at 5 and 10 Hz ($p = 0.163$ and $p = 0.224$, respectively). Altogether our results suggest that reported buspirone's pro-locomotor effect occurs at a time where there is a reflex depression followed by a second phase marked by enhancement of reflex excitability, denoting functional inhibitory control.

2. INTRODUCTION

During locomotion, afferent inputs from the hind limbs serve to control the excitability of spinal networks. They adjust motor output by direct impact on either motoneurons or interneurons, comprising those of the central pattern generator (CPG) that is responsible for locomotion (Rossignol, 2006). After complete spinal cord injury, sensory feedback becomes the only source of input remaining to the spinal cord: it has the power to re-arrange spinal circuits below the lesion, as shown by the positive outcome of treadmill training in adult cats (Lovely et al., 1986, Barbeau and Rossignol, 1987, Belanger et al., 1996), rats (Edgerton et al., 1997, Ichiyama et al., 2008, Otsoshi et al., 2009) and mice (Leblond et al., 2003). The plasticity involved in this recovery of locomotion necessarily entails changes in several reflex pathways (Côté et al., 2003, Côté and Gossard, 2004).

In spinal animals, pharmacological treatments that mimic neurotransmitters from severed, descending fibers also have neuromodulator effects on locomotor networks and can improve recovery of locomotion (Chau et al., 1998a, Chau et al., 1998b). As is the case with locomotor training, drugs that enable functional recovery also regulate spinal reflexes (Côté et al., 2003, Frigon et al., 2012). For example, in cats with complete spinal lesion, the noradrenergic agonist clonidine, which is known to trigger hind limb locomotion (Barbeau and Rossignol, 1987), was also found to modify spinal neuron responses to peripheral inputs (Barbeau and Rossignol, 1987, Chau et al., 1998a, Côté et al., 2003, Frigon et al., 2012). In rodents, serotonergic (5-HT) drugs are effective in triggering and facilitating locomotion after complete spinal lesion (Schmidt and Jordan, 2000, Slawinska et al., 2014). Recent work in our laboratory has established that treatment with the US Food and Drug Administration-approved partial 5-HT_{1A} receptor agonist buspirone (Loane and Politis, 2012) can initiate locomotion in the hind limbs of adult mice right after complete spinal lesion (Jeffrey-Gauthier et al., 2014). As drugs with pro-locomotor properties also modify reflex pathways, buspirone may alter reflex excitability in mice after complete spinal lesion.

The effects of 5-HT_{1A} agonists on spinal reflexes have been tested earlier in different animal models, but there is still no consensus today as to whether the outcome is excitatory or

inhibitory. On the one hand, in vitro results on isolated brainstem and spinal cord in neonatal rats indicate that buspirone decreases monosynaptic reflex excitability (Yomono et al., 1992). This observation concurs with other studies that have demonstrated 5-HT_{1A} receptor inhibition in reflex pathways (Nagano et al., 1988, Crick et al., 1994, Hasegawa and Ono, 1996a, Hasegawa and Ono, 1996b, Honda and Ono, 1999). On the other hand, some have reported excitatory effects of 5-HT_{1A} (Clarke et al., 1996), mainly by showing facilitatory effects on motoneuron depolarization (Takahashi and Berger, 1990, Zhang, 1991, Perrier et al., 2003, Grunnet et al., 2004) or monosynaptic reflex enhancement (Honda and Ono, 1999). Is it possible that substances with excitatory effects on locomotion also have inhibitory effects on spinal cord excitability?

The present study was performed with a newly-developed model of decerebrated mice and was designed to investigate the modulation of reflex pathways in the absence of anesthesia. This was required, since locomotion involves wide re-organization of reflex pathways, as shown mainly in decerebrated cat preparations in which new relays was described in the absence of anesthesia (McCrea, 2001). Some reflex pathways are thus state-dependent, meaning that they occur only when the CPG is driving locomotion or when drugs known to trigger locomotion are given (Gossard et al., 1994, Perreault et al., 1995, Leblond, 2000).

Here, the main objective is to assess the effect of buspirone, at a dose level that triggers locomotion, on H-reflex amplitude in adult decerebrated mice after acute spinal cord lesion. This reflex, the electrical analog of the tendon tap reflex, is primarily mediated by monosynaptic pathways (Misiaszek, 2003). The results show a biphasic effect of buspirone on the H-reflex: its amplitude is first decreased significantly, then increased significantly, starting 30 min after drug administration. This increase is still evident 60 min buspirone and is not associated with any significant changes in frequency-dependent depression (FDD) of the H-reflex. Some of these results have been presented in abstract form (Develle and Leblond, 2016).

3. METHODS

A. Animal care and ethics

Experiments were performed on 13 C57 mice, of either sex (Charles River Laboratories, Saint-Constant, Québec, Canada), weighing 20 to 30 g. Their living conditions were strictly controlled by laboratory and facility staff. They were housed in cages with food and water available ad libitum. All manipulations and procedures were in accordance with Canadian Council on Animal Care guidelines and were approved by the UQTR Animal Care Committee. The mice were randomly assigned to 1 of 2 groups in acute, terminal experiments to evaluate the effect of buspirone on the H-reflex: a test group (n=8) exposed to buspirone and controls (n=5) treated with saline.

B. Anesthesia

All surgeries were performed under isoflurane anesthesia (2% mixed with O₂ 95% and CO₂ 5%, 200 ml/min). General anesthesia was first induced through a mask: then, the animals were tracheotomized to maintain anesthesia and allow artificial ventilation (SAR-830/P Ventilator, CWE, Inc., Ardmore, PA, USA) adjusted to preserve expired CO₂ level between 3 and 4% (CapStar-100 CO₂ monitor, CWE, Inc.). Body temperature was monitored by rectal probe and maintained at 37±0.5°C with heating pad.

C. Spinalization

The objective was to measure the H-reflex after complete spinal cord section. It was performed early in the surgery to minimize the impact of the later decerebration on the spinal circuitry. The paravertebral muscles were cleared from both T8 vertebral laminae after skin

incision targeting the 8th thoracic vertebra (T8). Then, double laminectomy exposed the spinal cord at this level. After perforation of the dura mater with a needle, a small piece of lidocaine-soaked cotton (xylocaine 2%) was applied for 1 min to prevent uncontrolled secondary neural damage or lumbar spinal cord excitotoxicity. Then, the spinal cord was transected with micro-scissors and confirmed by visual observation of the gap between the rostral and caudal stumps. Finally, Surgicel® absorbable hemostat (Ethicon, Johnson & Johnson, USA) was inserted between the 2 parts of the spinal cord before the skin was sutured.

D. Decerebration

Spinal network activities are traditionally assessed in decerebrate preparations, especially from cats, rats and rabbits, with recent adaptation to mice (Nakanishi and Whelan, 2011, Dobson and Harris, 2012, Meehan et al., 2012). Data were, therefore, acquired in decerebrated, unanesthetized mice to avoid the unwanted effects of anesthesia. The carotid arteries were first ligated to minimize cerebral perfusion while the animals were secured in a stereotaxic frame (Model 980 Small Animal Spinal Unit, Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) equipped with a small mouse and neonatal rat adaptor (Stoelting Company, Wood Dale, IL, USA). They were then craniotomized, taking care to leave the superior sagittal sinus intact. Bone wax (Ethicon, Johnson & Johnson, USA) was applied to the skull when necessary to prevent bleeding. The Dura mater was removed gently to expose the cortex for transection with a razor blade 1 mm rostral to the lambda. The rostral part of neural tissue and the occipital cortex were removed, by gentle suctioning with an adapted micro-vacuum, corresponding to pre-collicular-pre-mamillar decerebration. The cavity was finally filled with Gelfoam® thin soak hemostat sponge (Pfizer Inc, New York, NY, USA), and the skin was closed with suture.

E. H-reflex recording

After decerebration, the left hind limb was fixed in extension and an incision was made on top of the gastrocnemius muscles to separate and expose the tibial nerve. A pool was formed with skin flaps and filled with mineral oil to avoid nerve desiccation. The tibial nerve was mounted on a home-made bipolar hook electrode for stimulation. One-ms single-pulsed stimulations were delivered by a constant-current stimulator (Model DS4, Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, UK) triggered by a computer-controlled sequencer (Power 1401 acquisition system, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK).

Paired, fine, multistrained stainless steel wires (AS631Cooner Wire, Chatsworth, CA, USA) were inserted under the skin, between the 2nd and 3rd medial toes, towards the intrinsic foot muscles, for electromyographic (EMG) recording. Signals were amplified 1,000x, bandpass-filtered at 30-3,000 Hz (Grass P55 AC Preamplifier, Natus Neurology, Inc., Pleasanton, CA USA), and digitized for data acquisition (Spike 2 software, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). A ground electrode was inserted in the skin between the stimulating and recording electrodes.

Anesthesia was stopped, followed by 60-min rest, which corresponds to approximately 120-150 min post-spinalization, to avoid undesirable anesthesia-induced effects.

F. Buspirone administration

The H-reflex was compared in groups of mice that received buspirone or saline. A catheter was inserted to facilitate i.p. administration without moving the animals. Buspirone (8 mg/kg, i.p.) was given in a volume of 0.1 cc, with the controls receiving the same amount of saline (0.9%).

G. Data acquisition and analysis

Stimulus-response curves (e.g. Fig. 1B) were charted by gradually increasing tibial nerve stimulation intensity to ascertain the maximal H-reflex (4-6 ms latency) concomitant with stable M-wave (1-3 ms latency). At this intensity, which corresponded to approximately 1.8x the motor threshold, Ia muscle spindle afferents were mainly activated. Responses to tibial nerve stimulation intensity were recorded before and every 10 min after the injection, for a total of 60 min. It allowed us to observe the evolution of reflex amplitude with time and treatment.

Spinal inhibitory processes were also tested before and 60 min after injection by varying stimulation frequency between 4 blocks of 30 stimulations (0.2, 5, 10 and 0.2 Hz; 60-s inter-block interval) to assess FDD. The first 5 responses of each block were discarded to allow H-reflex stabilization. Analyses comprised only recordings with stable M-wave throughout the protocol (<10% variation) to ensure recording stability. Note that, as illustrated in Figure 1A (bottom trace), some responses included a third deflection with longer latency beginning about 7-8 ms post-stimulation. This response was poorly depressed by stimulation frequency, in contrast to the response localized between 4 to 6 ms, and was not taken into account in H-reflex measurement.

Data were analyzed with Spike2 software (Cambridge Electronic Design) and Excel software (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Peak-to-peak amplitudes of the H-reflex and M-wave were measured to establish the H/M ratio so that the results could be compared between animals. Mean ratio at each time point was computed by averaging 30 stimulations at 0.2 Hz. In the FDD protocol, mean H/M ratio was averaged from 25 successive responses for each block.

Statistical analysis was conducted with Statistica software (version 13, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), and the significance threshold was set at $p \leq 0.05$. Normal distribution was assessed by the Kolmogorov-Smirnov test. Then, Greenhouse-Geisser-corrected 2-way ANOVA ascertained the effects of the intra-subject factor time and the inter-subject factor treatment on reflex amplitude. Post hoc Student's t-test targeted periods presenting significant

variations in comparison to pre-injection values. Finally, FDD at 60 min post-injection in buspirone-injected animals was tested by 2-way ANOVA to compare with inhibition in the pre-injection state.

4. RESULTS

Buspirone administration decreased spinal cord excitability in the first 20 min, followed by its increase 40 min later. This finding was indicated by reduction of H-reflex peak-to-peak amplitude early after treatment, followed by augmentation 40 min later.

A. H-reflex in acute spinal decerebrated mice

Stimulus-response curves were recorded for each mouse to establish at which intensity the H-reflex should be evoked to test the effect of buspirone. Typical examples of the H-reflex and stimulus-response curves are depicted in Figures 1A and 1B, respectively. Stimulation intensity was increased progressively until the whole pool of fibers in the tibial nerve was recruited, as indicated by a plateau being reached in the M-wave in Figure 1B. The H-reflex was usually evoked close to the motor threshold, and after an initial rise, it too plateaued and did not manifest a classical decrease after reaching maximum. This pattern was observed in all animals (N=13). Stimulation intensity was selected so that stable M-wave could be evoked as near as possible to beginning of the plateau (1.4T in the example depicted in Figure 1B).

B. Buspirone effect on the H-reflex

Figure 2A displays H-reflex raw traces averaged from 30 stimulations recorded from intrinsic foot muscles before, 10 and 40 min after buspirone administration in 1 mouse. Average H-

reflex decreased dramatically in this mouse 10 min after buspirone (grey trace), then increased considerably 40 min later (dotted trace).

Figure 2B illustrates that the H/M ratio (normalized to T0) changes over time in the buspirone but not in the saline group. In all groups combined, Greenhouse-Geisser-corrected 2-way ANOVA of the factors time and treatment indicated reflex amplitude variation over time (main effect: $F_{6,64} = 2.71$, $p = 0.020$). Moreover, this effect of time was associated with the treatment applied ($F_{6,64} = 3.61$, $p = 0.004$). Indeed, post hoc Student t-test first shows reflex amplitude being decreased by 31% by buspirone at T10, significantly different from T0 values ($p = 0.012$). This reflex inhibition was still significantly different at T20 ($p = 0.040$). Then, a transition phase led to a significant 48% increase of the H/M ratio from 40 min ($p = 0.009$) that plateaued at 60 min (T0-T50, $p = 0.036$, and T0-T60, $p = 0.031$). In contrast, post hoc testing revealed no significant differences in the saline-injected group over time ($p > 0.05$).

C. FDD of the H-reflex

The H-reflex was characterized by frequency-dependent behavior. As stimulation frequency was increased from 0.2 to 10 Hz, reflex amplitude was depressed in intact and acute spinal animals. Figure 3A is a typical example of FDD of the H-reflex in a mouse before buspirone treatment: higher frequency of stimulation at 5 or 10 Hz almost completely abolished the H-reflex. Figure 3B shows inhibition at 5 and 10 Hz in all buspirone-treated animals as reflex amplitude normalized to values obtained at 0.2 Hz frequency. Our results reflect significant reflex inhibition, depending on stimulation frequency (2-way ANOVA: $F_{1,36} = 438$, $p < 0.001$). Modulation of recorded reflex amplitude tended to be increased by treatment at 60 min post-dose (66.6% at 5 Hz and 68.9% at 10 Hz at pre-dose versus 78.6% at 5 Hz and 75.8% at 10 Hz 60 min post-dose). However, the difference was not significant, since statistical analysis did not detect any effect of treatment on the amplitude of frequency-dependent inhibition (2-way ANOVA: $F_{1,36} = 0.73$, $p = 0.408$).

5. DISCUSSION

The use of adult decerebrated mouse preparations allowed us to study the effect of buspirone on the H-reflex after acute spinal lesion in a system that was not altered by the presence of anesthetic drugs. The main study result was that buspirone had a depressive impact on H-reflex amplitude for the first 20 min after drug administration. This depressive outcome was then attenuated and even reversed to an increased effect on the H-reflex which became significant 40 min post-dose. Since FDD at 5 and 10 Hz remained similar to the pre-dose condition, the reflex enhancement observed at 40 min did not seem to be attributed to loss of inhibitor control.

A. Buspirone act as a 5HT_{1A} receptor agonist on the monosynaptic reflex

Buspirone is a selective partial agonist of 5-HT_{1A} receptors with some affinity for dopaminergic D₂ receptors (Loane and Politis, 2012). Since it has been shown that motoneuronal excitability is not affected by either D₂ agonist or antagonist (Han et al., 2007, Han and Whelan, 2009), we assume that the effect observed in our experiment with buspirone is mainly associated with 5-HT_{1A} receptors (see also D'Amico et al, 2017). The short-term impact of buspirone as a partial 5-HT_{1A} agonist, i.e., reflex reduction, concurs with the literature.

Indeed, monosynaptic reflex reduction has been shown with the 5-HT_{1A} agonist 8-OHDPAT in rats with complete spinal lesion under α -chloralose and urethane anesthesia (Nagano et al., 1988, Hasegawa and Ono, 1996a, Honda and Ono, 1999). However, reversal of this reflex excitability later post-treatment has not been reported so far. Such differences could be related to the use of decerebrated preparations (Meehan et al., 2017) that affect reflex modulation (Ho and Waite, 2002; see also Schmidt and Jordan, 2000). Indeed, experiments on decerebrated cats disclosed reversal of the influence of group I afferents from extensors after exposure to

clonidine or L-DOPA, drugs that promote locomotion in spinal cats (Conway et al., 1987, Gossard et al., 1994, Leblond, 2000).

In our study, the reflex evoked was primarily of a monosynaptic nature and was not subject to pathway change. However, low threshold stimulation might also activate oligosynaptic pathways or some other large-diameter afferent fibers, such as type Ib afferents, that are also in contact with motoneurons. Because such depolarization involves the polysynaptic circuitry, the motor response would have longer delay and may be dissociated from monosynaptic activation. Still, long-lasting effects on motoneurons are not excluded and could be implicated in signal amplitude recorded by EMG. Thus, the H-reflex remains under the control of different circuits that can act on afferents or directly on motoneurons of the reflex arc (Misiaszek, 2003) (Fig. 4).

5-HT_{1A} receptors are mainly present on dorsal laminae which are involved in afferent regulation (Giroux et al., 1999, Noga et al., 2009). Such participation of afferent modulation by 5-HT_{1A} receptors has been confirmed by Hasegawa and Ono (1996b) in rats. Monosynaptic reflexes evoked by dorsal root stimulation are depressed by 8-OHDPAT administration with no change in motoneuronal excitability. This suggests that reflex depression is induced by lowering neurotransmitter release at the presynaptic level. Such afferent regulation could be generated by 5-HT_{1A} receptors on afferent neurons and could be responsible for increased GABA-mediated inhibition (Gharagozloo et al., 1990).

It is not fully clear why the H-reflex was enhanced during the second phase of our experiment. To evaluate involvement of the spinal inhibition mechanism during this period, we measured FDD of the H-reflex. This inhibition is reported to mainly depend on GABA inhibitor potential (Kakinohana et al., 2006, Jolivald et al., 2008). The post-activation inhibitory circuit remained unchanged between pre-dose and 60 min post-dose in our experiment, suggesting that disinhibition or changes in GABAergic activity cannot explain the observed increase of reflex amplitude.

D'Amico et al. (2017) showed that systemic buspirone administration in awake humans reduces about 30% of F-wave amplitude, indicating direct change in motoneuron excitability. The absence of anesthesia in their study, as was the case in our mouse model, allowed

otherwise quiescent spinal networks to be active and participate in the modulation of membrane conductance, affecting motoneuronal responsiveness (Harvey et al., 2006a, Harvey et al., 2006b, Li et al., 2006, Murray et al., 2010; see also D'Amico et al., 2014). However, slowly-activated currents, like persistent inward currents, required long-duration input and could not be fully actuated by brief stimulations like the ones used in our study (Murray et al., 2011).

B. Opposite effect of 5HT1A according to receptor location on the motoneuron

At the synaptic level, 5-HT is also responsible for modulating fast-activated potassium channels via 5-HT_{1A} receptors (Jackson and White, 1990, Penington and Kelly, 1990). It was shown that 5HT_{1A} receptors inhibits TASK-1 potassium channels that would contribute to the excitatory effect of 5-HT on spinal motoneurons (Perrier et al., 2003). By lowering outward cation flux, 5-HT_{1A} receptors shortened the refractory period and facilitated motoneuronal depolarization (Grunnet et al., 2004, Santini and Porter, 2010). This mechanism augments motoneuronal excitability and enhances motor responses to synaptic stimulation. On the other hand, there are extrasynaptic 5-HT_{1A} receptors that can be activated by spill-over during high 5-HT release at the synaptic level or by systemic administration that are known to be inhibitory. Indeed, 5-HT_{1A} receptor stimulation on axon hillocks elicits inhibition of Nav channel opening time (Cotel et al., 2013, Perrier et al., 2013, Perrier and Cotel, 2015, Petersen et al., 2016). This lowers sodium depolarization during initial segment activation and thus decreases the probability of generating action potentials.

Thus, when large dose of buspirone is given, like in our experiments, 5-HT_{1A} receptors inhibit motoneuron output and decrease reflex amplitude through activity at the axon hillock sites even if there is an excitation at the synaptic level. This dual effects of 5-HT_{1A} receptors on motoneuronal excitability may be involved in the observed biphasic effect of buspirone over time on reflex amplitude through a switch in dominance of receptor type activity.

C. Biphasic effect of 5HT1A receptors over time

Drug action is concentration-dependent, and buspirone pharmacokinetics undergoes a biphasic elimination cycle (Sethy and Francis, 1988). The first half-life of the drug is reached after 24.8 min, a period that matches the transition phase of reflex amplitude in treated animals. Also, synaptosomes, the main structures implicated in 5-HT re-uptake in synapses (Henn and Hamberger, 1971), are not present at the axon hillock level. This region rely mainly on the participation of astrocytes that have been demonstrated to be involved in 5-HT re-uptake, especially at the extrasynaptic level (Henn and Hamberger, 1971, Ritchie et al., 1981, Kimelberg and Katz, 1985, De-Miguel et al., 2015). Such region-dependent differences in the 5-HT clearance mechanisms could explain the biphasic effect of buspirone on reflex amplitude over time.

Pharmacological activation of 5-HT1A receptors also induces desensitization by lowering reflex inhibition after secondary treatment (Seth et al., 1997). Loss of receptor activity in reflex inhibition could also be implicated in reflex response enhancement.

D. Reflex inhibition and locomotion

Despite its inhibitory effect on the H-reflex and motoneuron excitability, it was shown that buspirone promotes locomotor movements after spinal cord injury when combined with other treatments (Ung et al., 2011, Gerasimenko et al., 2015) or when applied alone in mice (Jeffrey-Gauthier et al., 2014). It indicates that locomotion can be triggered during depression of sensorimotor excitability induced by buspirone. This paradox is also observed with the 5-HT1A partial agonist 8-OHDPAT, which is known to inhibit the monosynaptic reflex (Nagano et al., 1988, Hasegawa and Ono, 1996a, Honda and Ono, 1999) and can facilitate recovery of locomotor function in spinal rats (Antri et al., 2003, Antri et al., 2005).

However, these observations seem to disagree with the results obtained during fictive locomotion in the brainstem-spinal cord of neonatal mice (Dunbar et al., 2010). In that study,

5-HT release during fictive locomotion was enhanced by citalopram, a selective re-uptake inhibitor, and a decreased burst duration and amplitude was observed. Since selective 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} antagonists reversed the inhibitory effect of citalopram, it was concluded that these receptors may be involved in rhythm inhibition. A similar conclusion, leading to general agreement on the inhibitory effect of 5-HT_{1A} receptors on locomotion (Perrier and Cotel, 2015), has been drawn previously in neonatal rats where blocking 5-HT_{1A/1B} receptors during motor activity, produced by brainstem stimulation, induced speed-up of the rhythm (Liu and Jordan, 2005). In both these studies, locomotor speed was impaired by 5-HT_{1A} receptor but the alternate pattern of locomotor rhythm was not blocked. As buspirone decreased motoneuron excitability through 5-HT_{1A} receptors (D'Amico et al., 2017), they probably lower CPG expression through motoneuronal inhibition.

Many studies employing different methodologies to induce locomotion have disclosed that reflex modulation is associated with locomotor expression (Grillner and Shik, 1973, McCrea, 2001, Frigon et al., 2012). Similarly, buspirone treatment induces spinal reflex re-organization and promotes locomotor activity that appears not to be evoked by direct CPG stimulation. Sensorimotor control could be a key in the pro-locomotor effect of buspirone. Since treatment facilitates CPG expression during at least the first 20 min (Jeffrey-Gauthier et al., 2014), it is possible to link reflex depression to CPG rehabilitation. However, more behavioral experiments are needed to associate the second phase, marked by increased reflex amplitude, with functional observations on the locomotor network. This reflex hyperexcitability is related to functional inhibitory control, much like a post-activation depression mechanism that is essential for motor task execution (Lee-Kubli and Calcutt, 2014). Such reflex sensitization, with the presence of strong FDD, is also seen in trained, chronic spinal rats in association with recovery of locomotor function (Côté et al., 2011). In its second phase, buspirone treatment reproduces the effect of training and should help to restore locomotor function. However, since FDD is already present at pre-dose in the acute condition, the outcome of treatment on this function is not fully clear and needs further investigation. Chronic spinal animals express low FDD and could serve to test the possibility that buspirone treatment could restore inhibitor function.

In conclusion, buspirone modulates reflex excitability. This modulation presents as biphasic activity, characterized in the first period by reflex depression and followed by late hyperreflexia. It is suggested that both phases contribute to improve locomotor expression.

6. Figure Legends

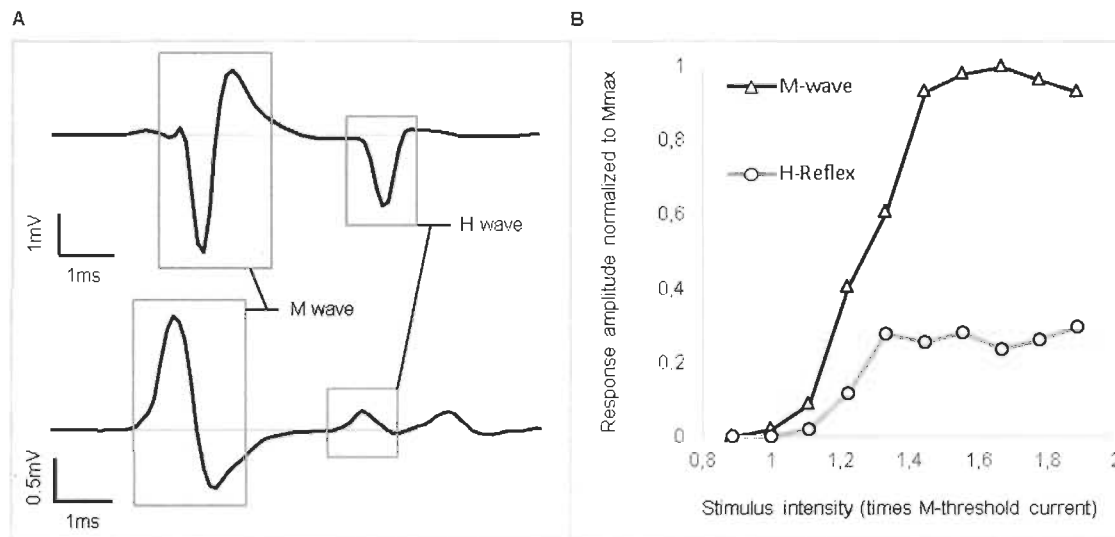


Figure 1. Raw traces of recorded signals and representative recruitment curve

A) EMG examples of raw traces recorded. The M-wave is the depolarization of the whole motoneuron pool activated by stimulation, whereas the H-wave is the motor response induced by primary afferent depolarization. B) Peak-to-peak amplitude of EMG responses recorded in intrinsic foot muscles by progressively increasing tibial nerve stimulation intensity. This stimulus-response curve is tested to find the stimulation intensity that will allow reflex amplitude evaluation. It should be around Hmax, which specifically activates Ia primary afferents, but stable M-wave response is also necessary to ensure that the stimulation electrode is stable, at the beginning of the M-wave plateau. In this particular example, stimulation around 1.4 times the motor threshold would be chosen.

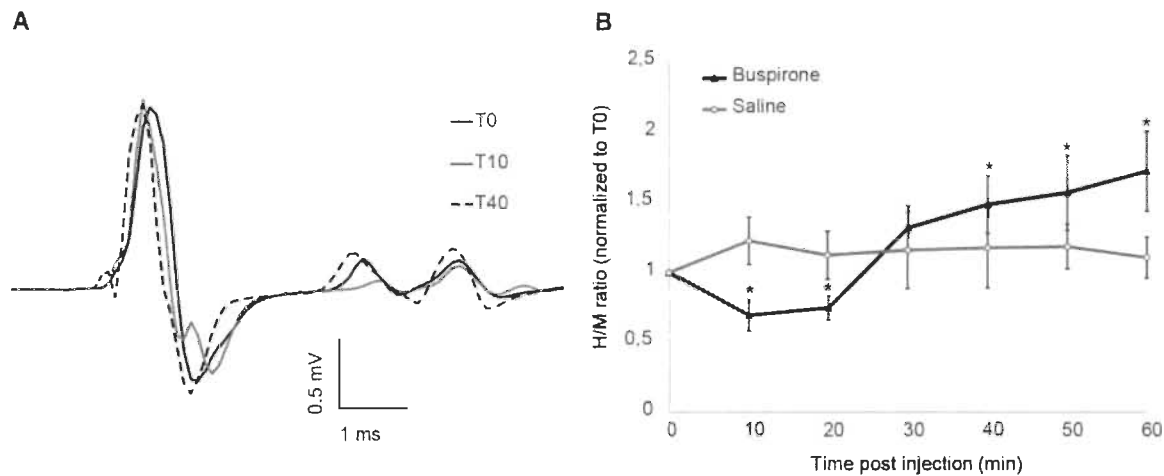


Figure 2. Effect of buspirone on the H-reflex

A) Mean traces obtained at 3 critical time points by averaging 30 stimulations at constant intensity in a buspirone-treated mouse. Peak-to-peak measurement of H-reflex amplitude shows an initial decrease at T10 (grey trace) vs T0 (black trace) and an increase at T40 (dotted trace). B) Representation of reflex amplitude evolution normalized to the pre-dose value by averaging all mice from both groups. Reflex amplitude is significantly decreased during the first 20 min post-dose and significantly increased after 40 min in buspirone-treated animals but not in saline-injected controls.

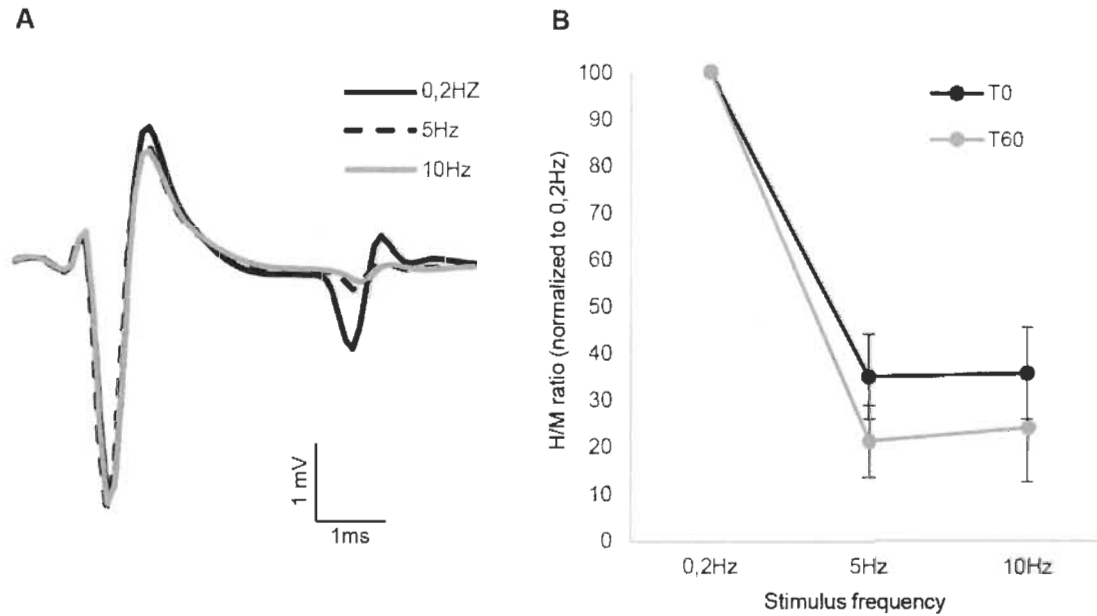


Figure 3. Reflex inhibition at 5 Hz and 10 Hz

A) Mean traces of 25 stimulations at 0.2 Hz, 5 Hz and 10 Hz in a mouse at pre-dose. Consistency in fiber recruitment by stimulation is assessed by stable M-wave between each trial. Only the H-reflex is depressed by stimulation frequency. B) Representation of mean reflex amplitude at different stimulation frequencies normalized to values at 0.2 Hz for the whole group before and 60 min after buspirone administration. Inhibition at 5 and 10 Hz does not present any significant difference between the 2 time points.

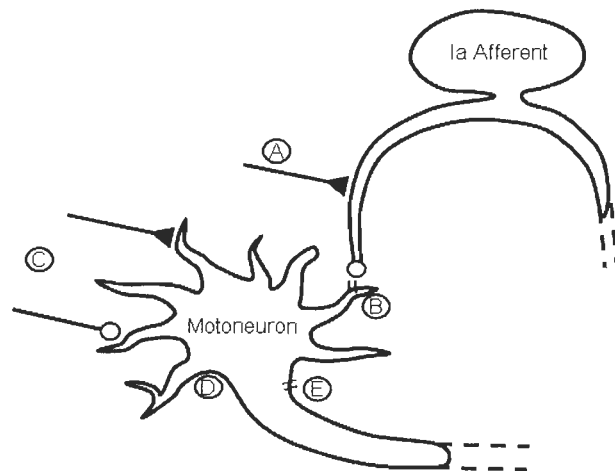


Figure 4. Schematic depiction of the H-reflex control system

Reflex arc constituted by Ia afferents contacting monosynaptically an homonymous motoneuron. A) First, synaptic transmission may be affected by presynaptic inhibition depleting neurotransmitter release by afferents. Then, generation of somatic motoneuronal potential depends on B) channel activity at synaptic level C) excitatory and inhibitory post-synaptic influences. D) Change occur in membrane properties. E) Finally, initial segment excitability gates motoneuronal output to muscles.

7. References

Antri M, Barthe JY, Mouffle C, Orsal D (2005) Long-lasting recovery of locomotor function in chronic spinal rat following chronic combined pharmacological stimulation of serotonergic receptors with 8-OHDPAT and quipazine. *Neuroscience Letters* 384:162-167.

Antri M, Mouffle C, Orsal D, Barthe JY (2003) 5-HT 1A receptors are involved in short- and long-term processes responsible for 5-HT-induced locomotor function recovery in chronic spinal rat. *European Journal of Neuroscience* 18:1963-1972.

Barbeau H, Rossignol S (1987) Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Research* 412:84-95.

Belanger M, Drew T, Provencher J, Rossignol S (1996) A comparison of treadmill locomotion in adult cats before and after spinal transection. *Journal of Neurophysiology* 76:471-491.

Chau C, Barbeau H, Rossignol S (1998a) Early locomotor training with clonidine in spinal cats. *Journal of Neurophysiology* 79:392-409.

Chau C, Barbeau H, Rossignol S (1998b) Effects of intrathecal alpha1- and alpha2-noradrenergic agonists and norepinephrine on locomotion in chronic spinal cats. *Journal of Neurophysiology* 79:2941-2963.

Clarke RW, Harris J, Houghton AK (1996) Spinal 5-HT-receptors and tonic modulation of transmission through a withdrawal reflex pathway in the decerebrated rabbit. *British Journal of Pharmacology* 119:1167-1176.

Conway BA, Hultborn H, Kiehn O (1987) Proprioceptive input resets central locomotor rhythm in the spinal cat. *Experimental Brain Research* 68:643-656.

Côté MP, Azzam GA, Lemay MA, Zhukareva V, Houlé JD (2011) Activity-dependent increase in neurotrophic factors is associated with an enhanced modulation of spinal reflexes after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma* 28:299-309.

Côté MP, Gossard JP (2004) Step training-dependent plasticity in spinal cutaneous pathways. *Journal of Neuroscience* 24:11317-11327.

Côté MP, Ménard A, Gossard JP (2003) Spinal cats on the treadmill: changes in load pathways. *Journal of Neuroscience* 23:2789-2796.

Cotel F, Exley R, Cragg SJ, Perrier JF (2013) Serotonin spillover onto the axon initial segment of motoneurons induces central fatigue by inhibiting action potential initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:4774-4779.

Crick H, Manuel NA, Wallis DI (1994) A novel 5-HT receptor or a combination of 5-HT receptor subtypes may mediate depression of a spinal monosynaptic reflex in vitro. *Neuropharmacology* 33:897-904.

D'Amico JM, Butler AA, Héroux ME, Cotel F, Perrier JF, Butler JE, Gandevia SC, Taylor JL (2017) Human motoneurone excitability is depressed by activation of serotonin 1A receptors with buspirone. *Journal of Physiology* 595:1763-1773.

D'Amico JM, Condliffe EG, Martins KJ, Bennett DJ, Gorassini MA (2014) Recovery of neuronal and network excitability after spinal cord injury and implications for spasticity. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 8:36.

De-Miguel FF, Leon-Pinzon C, Noguez P, Mendez B (2015) Serotonin release from the neuronal cell body and its long-lasting effects on the nervous system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370 (1672).

Develle Y, Leblond H (2016) Buspirone effect on H-reflex in acute decerebrated mice. SFN 46th Annual Meeting, San Diego, CA, USA.

Dobson KL, Harris J (2012) A detailed surgical method for mechanical decerebration of the rat. *Experimental Physiology* 97:693-698.

Dunbar MJ, Tran MA, Whelan PJ (2010) Endogenous extracellular serotonin modulates the spinal locomotor network of the neonatal mouse. *Journal of Physiology* 588:139-156.

Edgerton VR, De Leon RD, Tillakaratne N, Recktenwald M, Hodqson J, Roy RR (1997) Use-dependent plasticity in spinal stepping and standing. *Advances in Neurology* 72:233-247.

Frigon A, Johnson MD, Heckman CJ (2012) Differential modulation of crossed and uncrossed reflex pathways by clonidine in adult cats following complete spinal cord injury. *Journal of Physiology* 590:973-989.

Gerasimenko Y, Lu D, Modaber M, Zdunowski S, Gad P, Sayenko D, Morikawa E, Haakana P, Ferguson A, Roy RR, Edgerton VR (2015) Noninvasive Reactivation of Motor Descending Control after Paralysis. *Journal of Neurotrauma* 32:1968-1980.

Gharagozloo A, Holohean AM, Hackman JC, Davidoff RA (1990) Serotonin and GABA-induced depolarizations of frog primary afferent fibers. *Brain Research* 532:19-24.

Giroux N, Rossignol S, Reader TA (1999) Autoradiographic study of $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -noradrenergic and serotonin_{1A} receptors in the spinal cord of normal and chronically transected cats. *Journal of Comparative Neurology* 406:402-414.

Gossard JP, Brownstone RM, Barajon I, Hultborn H (1994) Transmission in a locomotor-related group Ib pathway from hindlimb extensor muscles in the cat. *Experimental Brain Research* 98:213-228.

Grillner S, Shik ML (1973) On the descending control of the lumbosacral spinal cord from the “mesencephalic locomotor region”. *Acta Physiologica Scandinavica* 87:320-333.

Grunnet M, Jespersen T, Perrier JF (2004) 5-HT 1A receptors modulate small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Journal of Neuroscience Research* 78:845-854.

Han P, Nakanishi ST, Tran MA, Whelan PJ (2007) Dopaminergic modulation of spinal neuronal excitability. *Journal of Neuroscience* 27:13192-13204.

Han P, Whelan PJ (2009) Modulation of AMPA currents by D1-like but not D2-like receptors in spinal motoneurons. *Neuroscience* 158:1699-1707.

Harvey PJ, Li X, Li Y, Bennett DJ (2006a) 5-HT₂ receptor activation facilitates a persistent sodium current and repetitive firing in spinal motoneurons of rats with and without chronic spinal cord injury. *Journal of Neurophysiology* 96:1158-1170.

Harvey PJ, Li X, Li Y, Bennett DJ (2006b) Endogenous monoamine receptor activation is essential for enabling persistent sodium currents and repetitive firing in rat spinal motoneurons. *Journal of Neurophysiology* 96:1171-1186.

Hasegawa Y, Ono H (1996a) Effect of (+/-)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin hydrobromide on spinal motor systems in anesthetized intact and spinalized rats. *European Journal of Pharmacology* 295:211-214.

Hasegawa Y, Ono H (1996b) Effects of 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A} receptor agonist, and DOI, a 5-HT_{2A/2C} agonist, on monosynaptic transmission in spinalized rats. *Brain Research* 738:158-161.

Henn FA, Hamberger A (1971) Glial cell function: uptake of transmitter substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68:2686-2690.

Ho SM, Waite PM (2002) Effects of different anesthetics on the paired-pulse depression of the H reflex in adult rat. *Experimental Neurology* 177:494-502.

Honda M, Ono H (1999) Differential effects of (R)- and (S)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin on the monosynaptic spinal reflex in rats. *European Journal of Pharmacology* 373:171-179.

Ichiyama RM, Courtine G, Gerasimenko YP, Yang GJ, van den Brand R, Lavrov IA, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR (2008) Step training reinforces specific spinal locomotor circuitry in adult spinal rats. *Journal of Neuroscience* 28:7370-7375.

Jackson D, White S (1990) Receptor subtypes mediating facilitation by serotonin of excitability of spinal motoneurons. *Neuropharmacology* 29:787-797.

Jeffrey-Gauthier R, Lefebvre B, Leblond H (2014) Acute and chronic effect of serotonergic neuromodulatory circuitry activation on locomotor recovery following dual spinal lesion paradigm in mice. SFN 44th Annual Meeting, Washington, DC, USA.

Jolivalt CG, Lee CA, Ramos KM, Calcutt NA (2008) Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride co-transporters. *Pain* 140:48-57.

Kakinohana O, Hefferan MP, Nakamura S, Kakinohana M, Galik J, Tomori Z, Marsala J, Yaksh TL, Marsala M (2006) Development of GABA-sensitive spasticity and rigidity in rats after transient spinal cord ischemia: A qualitative and quantitative electrophysiological and histopathological study. *Neuroscience* 141:1569-1583.

Kimelberg HK, Katz DM (1985) High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes. *Science* 228:889-891.

Leblond H (2000) PhD thesis: Contrôle supraspinal du réseau locomoteur extensogène chez le chat. Département de physiologie, Faculté de médecine, Université de Montréal. p. 257.

Leblond H, L'Espérance M, Orsal D, Rossignol S (2003) Treadmill locomotion in the intact and spinal mouse. *Journal of Neuroscience* 23:11411-11419.

Lee-Kubli CA, Calcutt NA (2014) Altered rate-dependent depression of the spinal H-reflex as an indicator of spinal disinhibition in models of neuropathic pain. *Pain* 155:250-260.

Li X, Murray KC, Harvey PJ, Ballou EW, Bennett DJ (2006) Serotonin facilitates a persistent calcium current in motoneurons of rats with and without chronic spinal cord injury. *Journal of Neurophysiology* 97:1236-1246.

Liu J, Jordan LM (2005) Stimulation of the parapyramidal region of the neonatal rat brain stem produces locomotor-like activity involving spinal 5-HT₇ and 5-HT_{2A} receptors. *Journal of Neurophysiology* 94:1392-1404.

Loane C, Politis M (2012) Buspirone: What is it all about? *Brain Research* 1461:111-118.

Lovely RG, Gregor RJ, Roy RR, Edgerton VR (1986) Effects of training on the recovery of full-weight-bearing stepping in the adult spinal cat. *Experimental Neurology* 92:421-435.

McCrea DA (2001) Spinal circuitry of sensorimotor control of locomotion. *Journal of Physiology* 533:41-50.

Meehan CF, Grondahl L, Nielsen JB, Hultborn H (2012) Fictive locomotion in the adult decerebrate and spinal mouse in vivo. *Journal of Physiology* 590:289-300.

Meehan CF, Mayr KA, Manuel M, Nakanishi ST, Whelan PJ (2017) Decerebrate mouse model for studies of the spinal cord circuits. *Nature Protocols* 12:732-747.

Misiaszek JE (2003) The H-reflex as a tool in neurophysiology: Its limitations and uses in understanding nervous system function. *Muscle & Nerve* 28:144-160.

Murray KC, Nakae A, Stephens MJ, Rank M, D'Amico J, Harvey PJ, Li X, Harris RL, Ballou EW, Anelli R, Heckman CJ, Mashimo T, Vavrek R, Sanelli L, Gorassini MA, Bennett DJ, Fouad K (2010) Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT(2C) receptors. *Nature Medicine* 16:694-700.

Murray KC, Stephens MJ, Rank M, Amico J, Gorassini MA, Bennett DJ (2011) Polysynaptic excitatory postsynaptic potentials that trigger spasms after spinal cord injury in rats are inhibited by 5-HT1B and 5-HT1F receptors. *Journal of Neurophysiology* 106:925-943.

Nagano N, Ono H, Fukuda H (1988) Functional significance of subtypes of 5-HT receptors in the rat spinal reflex pathway. *General Pharmacology: The Vascular System* 19:789-793.

Nakanishi ST, Whelan PJ (2011) A decerebrate adult mouse model for examining the sensorimotor control of locomotion. *Journal of Neurophysiology* 107:500-515.

Noga BR, Johnson DM, Riesgo MI, Pinzon A (2009) Locomotor-activated neurons of the cat. I. Serotonergic innervation and co-localization of 5-HT7, 5-HT2A and 5-HT1A receptors in the thoraco-lumbar spinal cord. *Journal of Neurophysiology* 102:1560-1576.

Otoshi CK, Walwyn WM, Tillakaratne NJ, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR (2009) Distribution and localization of 5-HT(1A) receptors in the rat lumbar spinal cord after transection and deafferentation. *Journal of Neurotrauma* 26:575-584.

Penington NJ, Kelly JS (1990) Serotonin receptor activation reduces calcium current in an acutely dissociated adult central neuron. *Neuron* 4:751-758.

Perreault MC, Angel MJ, Guertin P, McCrea DA (1995) Effects of stimulation of hindlimb flexor group II afferents during fictive locomotion in the cat. *Journal of Physiology* 487:211-220.

Perrier JF, Rasmussen HB, Christensen RK, Petersen AV (2013) Modulation of the intrinsic properties of motoneurons by serotonin. *Current Pharmaceutical Design* 19:4371-4384.

Perrier JF, Alaburda A, Hounsgaard J (2003) 5-HT(1A) receptors increase excitability of spinal motoneurons by inhibiting a TASK-1-like K(+) current in the adult turtle. *Journal of Physiology* 548:485-492.

Perrier JF, Cotel F (2015) Serotonergic modulation of spinal motor control. *Current Opinion in Neurobiology* 33:1-7.

Petersen AV, Cotel F, Perrier JF (2016) Plasticity of the Axon Initial Segment: Fast and Slow Processes with Multiple Functional Roles. *Neuroscientist* 2016 May 3.

Ritchie T, Glusman S, Haber B (1981) The filum terminale of the frog spinal cord, a nontransformed glial preparation: II. Uptake of serotonin. *Neurochemical Research* 6:441-452.

Rossignol S (2006) Plasticity of connections underlying locomotor recovery after central and/or peripheral lesions in the adult mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361:1647-1671.

Santini E, Porter JT (2010) M-type potassium channels modulate the intrinsic excitability of infralimbic neurons and regulate fear expression and extinction. *Journal of Neuroscience* 30:12379-12386.

Schmidt BJ, Jordan LM (2000) The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain Research Bulletin* 53:689-710.

Seth P, Gajendiran M, Ganguly DK (1997) Desensitization of spinal 5-HT_{1A} receptors to 8-OH-DPAT: an in vivo spinal reflex study. *Neuroreport* 8:2489-2493.

Sethy V, Francis J (1988) Pharmacokinetics of buspirone as determined by ex vivo (3H)-DPAT binding. *Life Sciences* 42:1045-1048.

Slawinska U, Miazga K, Jordan L (2014) The role of serotonin in the control of locomotor movements and strategies for restoring locomotion after spinal cord injury. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 74:172-187.

Takahashi T, Berger AJ (1990) Direct excitation of rat spinal motoneurons by serotonin. *Journal of Physiology* 423:63-76.

Ung RV, Rouleau P, Guertin PA (2011) Functional and physiological effects of treadmill training induced by buspirone, carbidopa, and L-DOPA in clenbuterol-treated paraplegic mice. *Neurorehabilitation and Neural Repair* 26:385-394.

Yomono HS, Suzuki H, Yoshioka K (1992) Serotonergic fibers induce a long-lasting inhibition of monosynaptic reflex in the neonatal rat spinal cord. *Neuroscience* 47:521-531.

Zhang L (1991) Effects of 5-hydroxytryptamine on cat spinal motoneurons. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 69:154-163.

Chapitre 3 : Discussion et conclusion

L'étude présentée dans ce document s'intéresse aux modifications du réflexe-H produit par l'administration de buspirone chez un tout nouveau modèle de souris décérébrée non anesthésiée suite à une spinalisation midthoracique. Les résultats obtenus indiquent une modulation biphasique du réflexe. Dans un premier temps une réduction significative de l'amplitude de la réponse réflexe est observée suivie d'une période d'augmentation du réflexe. Par ailleurs aucun changement au niveau des circuits responsables de l'inhibition postactivation du réflexe n'est enregistré entre la phase d'hyperexcitabilité à 60 minutes post dose et la condition prédose. La discussion de l'article présenté ci-dessus répertorie les arguments en faveur d'une implication des récepteurs 5-HT_{1A} dans la dépression du réflexe ainsi que les éventuelles pistes pouvant expliquer la hausse d'amplitude observée plus tardivement sous l'effet de la buspirone. Aussi cette discussion plus globale sera davantage employée à l'élaboration d'un lien entre la récupération motrice et les données physiologiques observées au niveau du réflexe lors du traitement. Les principales données fonctionnelles ont été observées sur une période de temps correspondant à la phase hyporéflexique. Une première partie sera consacrée à comprendre comment une dépression du réflexe peut promouvoir la récupération motrice. Des éléments démontrant l'implication des 5-HT_{1A} dans une récupération motrice durable existent également. Une seconde partie sera donc accordée à la mise en relation des données obtenues dans la seconde phase plus tardive et leur possible lien avec le maintien des fonctions motrices suite au traitement. Enfin une critique sera réalisée sur le modèle utilisée en vue de mettre en lumière les limites de l'étude et s'étendre sur les projets pouvant s'avérer complémentaires.

1. Action prolocomotrice des récepteurs 5-HT_{1A} en périphérie du générateur de rythme

Comme développé dans la discussion de l'article, la phase de dépression du réflexe-H lors du traitement semble impliquer les récepteurs 5-HT_{1A} (Yomono et al., 1992, Hasegawa and Ono, 1996a, Hasegawa and Ono, 1996b, Seth et al., 1997). Or un traitement ciblant ces récepteurs chez des souris spinales 2 jours seulement après la lésion promeut la récupération de la locomotion (Jeffrey-Gauthier et al., 2014). La stimulation des 5-HT_{1A} favorise donc l'expression du réseau locomoteur. Cette entité peut être subdivisée en deux circuits distincts (Brown, 1911, Grillner and Zangger, 1979). Le premier a pour fonction de produire le rythme tandis que le second permet de dessiner le patron en coordonnant les différents muscles. L'utilisation d'agoniste 5-HT_{1A} ne permet pas le déclenchement de locomotion fictive chez le rat néonatal et agit en tant qu'inhibiteur du rythme en prolongeant la durée des bouffées d'activité (Beato and Nistri, 1998, Liu and Jordan, 2005, Dunbar et al., 2010). Ces récepteurs ne semblent donc pas agir directement sur le générateur de rythme. La stimulation des 5-HT_{1A} dans la locomotion révèle donc un effet en périphérie de ce réseau. Comme l'appui les résultats de l'étude présentée ici ces récepteurs sont capables d'agir sur la réponse réflexe. Or il a été développé précédemment qu'une réorganisation du système réflexe est nécessaire en vue de permettre l'expression de la locomotion. Il semble donc que la 5-HT_{1A} soit davantage impliqués dans la formation d'un état synergique entre le mouvement et les réflexes proprioceptifs.

2. Rôle de l'inhibition du réflexe dans l'expression de la locomotion

D'autre part, l'augmentation de l'excitabilité des réseaux spinaux par les 5-HT₂ permet de déclencher des décharges rythmiques chez des moelles isolées de souris néonatales (Dunbar et

al., 2010). La facilitation du système sensorimoteur semble donc favoriser l'expression du rythme locomoteur. Il apparaît donc paradoxal que la dépression du réflexe par la 5-HT_{1A} permette la récupération motrice. Néanmoins, l'hypersensibilisation du réseau qui survient suite à une lésion de la moelle épinière est décrite comme délétère à l'évocation du mouvement locomoteur. Cet aspect provient en partie de la perte des systèmes de régulation de la coordination. Les circuits inhibiteurs sont déprimés en phase chronique chez les animaux spinaux (Côté et al., 2011). L'absence de contrôle inhibiteur est alors à l'origine de réflexes non coordonnés (Lee-Kubli and Calcutt, 2014). La locomotion réelle sur tapis roulant se distingue de la locomotion fictive par la participation des afférences et des réponses motrices réflexes qu'ils génèrent dans le patron d'activité évoqué. Afin d'autoriser l'exécution correct du mouvement il est donc nécessaire d'obtenir un état d'excitabilité spécifique du système sensorimoteur favorisant une synergie des réflexes proprioceptifs avec l'activité motrice. L'hyperexcitabilité générale du réseau sensorimoteur ainsi que l'absence de contrôle inhibiteur s'oppose à cet effet et se traduit alors par le développement de spasticité. Ce comportement moteur débilitant bloque la réalisation d'un mouvement coordonné et ne permet donc pas l'instauration du patron locomoteur. La dépression du système via la stimulation des 5-HT_{1A} semble donc participer à la récupération d'un niveau d'excitabilité propice à l'évocation de la locomotion. De plus, l'utilisation d'agoniste 5-HT_{1A} déprime le réflexe également chez des animaux anesthésiés où l'influence de réseau comme le CPG sur la réponse réflexe observée peut être limitée. Aussi un effet du traitement directement sur la boucle réflexe est suggéré et soutenu par la présence des récepteurs 5-HT_{1A} au niveau des afférences et des motoneurones (Gharagozloo et al., 1990, Giroux et al., 1999). Ces récepteurs seraient donc davantage impliqués dans la régulation du système sensorimoteur en périphérie du CPG permettant ainsi un contrôle accru du réflexe et la mise en place d'un état spécifique propice à l'expression de la locomotion.

3. Participation de l'excitation du réseau dans le maintien des fonctions locomotrices

Le traitement par la buspirone présente également une seconde phase qui survient à long terme et favorise l'hyperexcitabilité du réflexe. Il a été montré que cet état du système sensorimoteur a un effet délétère sur la capacité d'expression de la locomotion (Lee-Kubli and Calcutt, 2014). Néanmoins, du fait que l'inhibition post-activation demeure maintenue lors de cette phase, le système de contrôle inhibiteur semble demeurer fonctionnel. Il existe donc encore un mécanisme de filtrage actif des informations sensorielles. L'hypersensibilité de la réponse occasionne ainsi une facilitation du recrutement des fibres motrices tout en maintenant l'inhibition nécessaire à la sélection de l'information vers les motoneurones. Ce faisant un comportement moteur spécifique tel que la locomotion devient davantage susceptible d'être évoqué. Un effet similaire est obtenu par l'utilisation de quipazine un agoniste des récepteur 5-HT_{2A}. La 5-HT_{2A} favorise une excitation du système par une potentialisation des effets du glutamate (Dantsuji et al., 2016) tout en maintenant l'efficacité du système GABAergique via l'activité des canaux KCC2 (Bos et al., 2013). L'utilisation de cette drogue favorise également la récupération de la marche après une blessure de la moelle épinière (Antri et al., 2005). La phase d'augmentation de la réponse réflexe suite au traitement par buspirone n'est donc pas nécessairement contreproductive du fait qu'un maintien du système inhibiteur est également enregistré. Un état similaire peut également être observé suite à l'entraînement d'animaux spinaux (Côté et al., 2011). Parallèlement à l'amélioration des capacités locomotrices, les animaux entraînés de façon passive ou active présentent une augmentation de l'amplitude du réflexe ainsi qu'une récupération d'un contrôle inhibiteur des afférences par rapport aux rats spinaux non entraînés qui récupèrent alors de façon moins efficace. Par ailleurs l'effet positif de l'entraînement sur la locomotion a également été associé à une augmentation de l'activité des récepteurs 5-HT_{1A} (Otoshi et al., 2009). Ceci soutient l'implication de ce sous récepteur dans la capacité de récupération des fonctions motrices chez l'animal spinal. Cependant, l'inhibition post-activation est déjà très présente avant le traitement. Si une tendance semble indiquer une augmentation de l'inhibition fréquence dépendante du réflexe sous l'effet de la buspirone, cette observation demeure non significative. Elle peut également être associée à l'amplitude plus élevée du réflexe qui devient alors plus sensible à l'inhibition (Crone et al., 1990). Il est donc possible qu'un seuil plafond soit atteint et qu'il ne soit pas possible d'observer une éventuelle stimulation de l'efficacité du système inhibiteur par la buspirone. En revanche ce résultat confirme qu'un agoniste 5-HT_{1A} ne déprime pas l'efficacité du

GABA. En vue de valider si la buspirone est en mesure de potentialiser l'inhibition post-activation il pourrait être envisagé d'utiliser des souris spinales chroniques non entraînées. Ces animaux présentent alors un mécanisme de dépression fréquence dépendante déficient (Côté et al., 2011) qui offrirait la possibilité d'observer la restauration des fonctions inhibitrices. Ce modèle permettrait ainsi de distinguer un simple effet passif d'une réelle potentialisation de ce mécanisme de contrôle inhibiteur lors d'un traitement par la buspirone. Par ailleurs il autoriserait également la comparaison de l'effet de la buspirone sur le réflexe dans une moelle présentant une réorganisation neuronale propre à une hypostimulation chronique par les voies descendantes. La réalisation d'une telle expérience appuierait le rôle des mécanismes sus-développés dans l'effet prolocomoteur de la buspirone chez des souris 2 jours post lésions.

4. Renversement de l'effet de la buspirone sur le réflexe au cours du temps

Il a été discuté dans l'article que l'activité des 5-HT_{1A} notamment au niveau des motoneurones présente des effets variables dépendamment de la localisation du récepteur sur le neurone (Perrier, 2013). La dualité de l'effet de ces récepteurs sur l'excitabilité du neurone pourrait contribuer au profil biphasique de l'évolution de l'amplitude du réflexe observé suite au traitement. Cette hypothèse suppose une prédominance des récepteurs du cône axonique responsable de l'inhibition du potentiel d'action dans les premières 20 minutes puis des récepteurs somatiques impliqués dans la réduction de la période réfractaire. L'administration systémique de la drogue suppose une répartition de la concentration en médication égale dans le milieu et donc une costimulation de ces deux sites. Toutefois le blocage de la dépolarisation du segment initial empêche l'émission de potentiel axonique et réduit l'amplitude de la réponse motrice. De ce fait les changements d'excitabilité au niveau somatique ou synaptiques sont masqués lors de l'observation du signal électromyographique. La phase de transition entre les deux phases correspond à la première période de demi-vie de la molécule. Il est donc possible que les processus de recapture ou d'élimination de la molécule puissent intervenir

dans le renversement de l'effet du traitement. Dans ce sens, la recapture de la sérotonine fait intervenir des structures différentes aux niveaux synaptiques et extrasynaptiques pouvant être à l'origine d'une élimination inégale de la sérotonine entre ces deux sites (Henn and Hamberger, 1971, Kimelberg and Katz, 1985, De-Miguel et al., 2015). Si la concentration de ligand représente un facteur majeur dans l'activité des récepteurs, la sensibilité de ce dernier, soit sa capacité à déclencher la réaction métabotrope pour une concentration en ligand donnée, influe également sur l'effet observé. Or l'application localisée d'agoniste 5-HT_{1A} autour du corps cellulaire induit une dépolarisation du motoneurone dans 9 cas sur 11 (Perrier and Cotel, 2008). Il semble exister une différence de sensibilité entre les récepteurs dépolarisant et hyperpolarisant pouvant participer au renversement de l'effet dominant qui s'observe avec le temps autour de la période de première demi-vie de la buspirone.

5. Conclusion

En conclusion, les résultats présentés ici tendent à indiquer un effet de contrôle de la buspirone sur les circuits réflexes qui pourrait participer à la facilitation de l'expression de la locomotion chez la souris spinale adulte. Cette observation appuie l'importance du rôle des afférences dans la locomotion. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes autorisant un état de synergie entre le système sensoriel et moteur en vue de développer les stratégies de réhabilitation du réseau locomoteur suite à une lésion médullaire. A ce jour, l'entraînement passif sur vélo motorisé des membres paralysés constitue un des rares traitements efficaces pour lutter contre les symptômes débilissants occasionnés par la dérégulation du système sensorimoteur. En facilitant la restauration d'un réseau fonctionnel, l'utilisation d'un traitement à la buspirone permettrait d'accélérer le processus de réhabilitation des circuits neuronaux spinaux. Cette stratégie hybride apparaît particulièrement efficace du fait que les récepteurs 5-HT_{1A} ciblés par la buspirone semblent également impliqués dans la récupération d'autres fonctions autonomes comme la respiration et la miction qui sont également affectés lors de blessures de la moelle épinière.

Bibliographie

Adams MM, Hicks AL (2005) Spasticity after spinal cord injury. *Spinal Cord* 43:577-586.

Akay T (2014) Long-term measurement of muscle denervation and locomotor behavior in individual wild-type and ALS model mice. *Journal of Neurophysiology* 111:694-703.

Aloyo VJ, Berg KA, Spampinato U, Clarke WP, Harvey JA (2009) Current status of inverse agonism at serotonin_{2A} (5-HT_{2A}) and 5-HT_{2C} receptors. *Pharmacology & Therapeutics* 121:160-173.

Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G, Artigas F (2004) Co-expression and in vivo interaction of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cerebral cortex* 14:281-299.

Andén N-E, Häggendal J, Magnusson T, Rosengren E (1964) The Time Course of the Disappearance of Noradrenaline and 5-Hydroxytryptamine in the Spinal Cord after Transection. *Acta Physiologica Scandinavica* 62:115-118.

Antri M, Barthe JY, Mouffle C, Orsal D (2005) Long-lasting recovery of locomotor function in chronic spinal rat following chronic combined pharmacological stimulation of serotonergic receptors with 8-OHDPAT and quipazine. *Neuroscience Letters* 384:162-167.

Anwyl R (1990) Neurophysiological actions of 5-hydroxytryptamine in the vertebrate nervous system. *Progress in Neurobiology* 35:451-468.

Armstrong DM (1986) Supraspinal contributions to the initiation and control of locomotion in the cat. *Progress in Neurobiology* 26:273-361.

Aston-Jones G, Deisseroth K (2013) Recent advances in optogenetics and pharmacogenetics. *Brain Research* 1511:1-5.

Baldissera F, Lundberg A, Udo M (1972) Activity evoked from the mesencephalic tegmentum in descending pathways other than the rubrospinal tract. *Experimental Brain Research* 15:133-150.

Barbeau H, Rossignol S (1987) Recovery of locomotion after chronic spinalization in the adult cat. *Brain Research* 412:84-95.

Barbeau H, Rossignol S (1991) Initiation and modulation of the locomotor pattern in the adult chronic spinal cat by noradrenergic, serotonergic and dopaminergic drugs. *Brain Research* 546:250-260.

Beato M, Nistri A (1998) Serotonin-induced inhibition of locomotor rhythm of the rat isolated spinal cord is mediated by the 5-HT₁ receptor class. *Proc Biol Sci* 265:2073-2080.

Bennett DJ, Gorassini M, Fouad K, Sanelli L, Han Y, Cheng J (1999) Spasticity in Rats With Sacral Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma* 16:69-84.

Bennett DJ, Li Y, Harvey PJ, Gorassini M (2001) Evidence for Plateau Potentials in Tail Motoneurons of Awake Chronic Spinal Rats With Spasticity. *Journal of Neurophysiology* 86:1972-1982.

Bennett DJ, Sanelli L, Cooke CL, Harvey PJ, Gorassini MA (2004) Spastic Long-Lasting Reflexes in the Awake Rat After Sacral Spinal Cord Injury. *Journal of Neurophysiology* 91:2247-2258.

Berg KA, Dunlop J, Sanchez T, Silva M, Clarke WP (2008) A Conservative, Single-Amino Acid Substitution in the Second Cytoplasmic Domain of the Human Serotonin 2C Receptor Alters Both Ligand-Dependent and -Independent Receptor Signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 324:1084-1092.

Bos R, Sadlaoud K, Boulenguez P, Buttigieg D, Liabeuf S, Brocard C, Haase G, Bras H, Vinay L (2013) Activation of 5-HT_{2A} receptors upregulates the function of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:348-353.

Boulenguez B, Liabeuf S, Bos R, Bras H, Jean-Xavier C, Brocard C, Stil A, Darbon P, Cattaert D, Delpire E, Marsala M, Vinay L (2010) Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nature Medicine* 16:302-307.

Bourgoin S, Oliveras JL, Bruxelle J, Hamon M, Besson JM (1980) Electrical stimulation of the nucleus raphe magnus in the rat. Effects on 5-HT metabolism in the spinal cord. *Brain Research* 194:377-389.

Brown TG (1911) The Intrinsic Factors in the Act of Progression in the Mammal. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing Papers of a Biological Character* 84:308-319.

Buffenoir K, Decq P, Perot C (2013) Time Course of the Soleus M Response and H Reflex after Lidocaine Tibial Nerve Block in the Rat. *The Scientific World Journal* 2013:912716.

Burke RE, Degtyarenko AM, Simon ES (2001) Patterns of Locomotor Drive to Motoneurons and Last-Order Interneurons: Clues to the Structure of the CPG. *Journal of Neurophysiology* 86:447-462.

Cabaj AM, Majczyński H, Couto E, Gardiner PF, Stecina K, Sławińska U, Jordan LM (2016) Serotonin controls initiation of locomotion and afferent modulation of coordination via 5-HT₇ receptors in adult rats. *The Journal of Physiology* 595:301-320.

Carlsson A, Magnusson T, Rosengren E (1963) 5-Hydroxytryptamine of the spinal cord normally and after transection. *Experientia* 19:359-359.

Carp JS, Tennissen AM, Chen XY, Wolpaw JR (2006) H-Reflex Operant Conditioning in Mice. *Journal of Neurophysiology* 96:1718-1727.

Cazalets J-R, Borde M, Clarac F (1995) Localization and organization of the central pattern generator for hindlimb locomotion in newborn rat. *The Journal of neuroscience* 15:4943-4951.

Cazalets JR, Sqalli-Houssaini Y, Clarac F (1992) Activation of the central pattern generators for locomotion by serotonin and excitatory amino acids in neonatal rat. *The Journal of Physiology* 455:187-204.

Conway BA, Hultborn H, Kiehn O (1987) Proprioceptive input resets central locomotor rhythm in the spinal cat. *Experimental Brain Research* 68:643-656.

Cornide-Petronio ME, Fernández-López B, Barreiro-Iglesias A, Rodicio MC (2014) Traumatic injury induces changes in the expression of the serotonin 1A receptor in the spinal cord of lamprays. *Neuropharmacology* 77:369-378.

Côté M-P, Azzam GA, Lemay MA, Zhukareva V, Houlé JD (2011) Activity-Dependent Increase in Neurotrophic Factors Is Associated with an Enhanced Modulation of Spinal Reflexes after Spinal Cord Injury. *Journal of Neurotrauma* 28:299-309.

Côté M-P, Gandhi S, Zambrotta M, Houlé JD (2014) Exercise Modulates Chloride Homeostasis after Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience* 34:8976-8987.

Cotel F, Exley R, Cragg SJ, Perrier J-F (2013) Serotonin spillover onto the axon initial segment of motoneurons induces central fatigue by inhibiting action potential initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:4774-4779.

Cowley K, Schmidt B (1997) Regional distribution of the locomotor pattern-generating network in the neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* 77:247-259.

Cowley KC, Schmidt BJ (1995) Effects of inhibitory amino acid antagonists on reciprocal inhibitory interactions during rhythmic motor activity in the in vitro neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* 74:1109-1117.

Crone C, Hultborn H, Mazières L, Morin C, Nielsen J, Pierrot-Deseilligny E (1990) Sensitivity of monosynaptic test reflexes to facilitation and inhibition as a function of the test reflex size: a study in man and the cat. *Experimental Brain Research* 81:35-45.

Curtis DR, Eccles JC (1960) Synaptic action during and after repetitive stimulation. *The Journal of Physiology* 150:374-398.

D'Amico JM, Butler AA, Héroux ME, Cotel F, Perrier J-FM, Butler JE, Gandevia SC, Taylor JL (2016) Human Motoneurone Excitability is Depressed by Activation of 5HT1A Receptors with Buspirone. *The Journal of Physiology* 595:1763-1773.

D'Amico JM, Condliffe EG, Martins KJB, Bennett DJ, Gorassini MA (2014) Recovery of neuronal and network excitability after spinal cord injury and implications for spasticity. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 8:36.

Dantsuji M, Nakamura S, Nakayama A, Mochizuki A, Kiyomoto M, Park S, Bae Y, Ozeki M, Inoue T (2016) serotonergic modulation of glutamate-evoked responses through 5-HT2A receptors in the dendrites of rat jaw-closing motoneurons. SFN 46th annual meeting, San Diego, CA, USA.

Daval G, Vergé D, Basbaum AI, Bourgoin S, Hamon M (1987) Autoradiographic evidence of serotonin₁ binding sites on primary afferent fibres in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience Letters* 83:71-76.

De-Miguel FF, Leon-Pinzon C, Noguez P, Mendez B (2015) Serotonin release from the neuronal cell body and its long-lasting effects on the nervous system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370.

Degtyarenko AM, Simon ES, Burke RE (1998) Locomotor Modulation of Disynaptic EPSPs From the Mesencephalic Locomotor Region in Cat Motoneurons. *Journal of Neurophysiology* 80:3284-3296.

Diamantopoulos E, Olsen PZ (1967) Excitability of motor neurones in spinal shock in man. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 30:427-431.

Dimitrijevic MR, Gerasimenko Y, Pinter MM (1998) Evidence for a Spinal Central Pattern Generator in Humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 860:360-376.

Ditunno JF, Little JW, Tessler A, Burns AS (2004) Spinal shock revisited: a four-phase model. *Spinal Cord* 42:383-395.

Dobson K, Harris J (2012) A detailed surgical method for mechanical decerebration of the rat. *Exp Physiol* 97:693-698.

Doly S, Fischer J, Brisorgueil M-J, Vergé D, Conrath M (2005) Pre- and postsynaptic localization of the 5-HT₇ receptor in rat dorsal spinal cord: Immunocytochemical evidence. *The Journal of Comparative Neurology* 490:256-269.

Dong X-x, Wang Y, Qin Z-h (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica* 30:379-387.

Dueñas SH, Rudomin P (1988) Excitability changes of ankle extensor group Ia and Ib fibers during fictive locomotion in the cat. *Experimental Brain Research* 70:15-25.

Dunbar MJ, Tran MA, Whelan PJ (2010) Endogenous extracellular serotonin modulates the spinal locomotor network of the neonatal mouse. *The Journal of Physiology* 588:139-156.

Duysens J, Pearson KG (1980) Inhibition of flexor burst generator by loading ankle extensor muscles in walking cats. *Brain Research* 187:321-332.

Eccles JC, Eccles RM, Lundberg A (1957) Synaptic actions on motoneurons caused by impulses in Golgi tendon organ afferents. *The Journal of Physiology* 138:227-252.

Ehlers MD (2003) Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nature Neuroscience* 6:231-242.

ElBasiouny SM, Schuster JE, Heckman CJ (2010) Persistent inward currents in spinal motoneurons: Important for normal function but potentially harmful after spinal cord injury and in amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical neurophysiology : official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 121:1669-1679.

Emson P, Rossor M, Tohyama M (1986) progress in brain research: peptides and neurological disease: Elsevier Biomedical Press.

Engberg I (1964) Reflexes to Toe Muscles in the Cat's Hindlimb. *Progress in Brain Research* 12:274-279.

Engberg I, Lundberg A (1969) An Electromyographic Analysis of Muscular Activity in the Hindlimb of the Cat during Unrestrained Locomotion. *Acta Physiologica Scandinavica* 75:614-630.

Engberg I, Lundberg A, Ryall RW (1968) Reticulospinal inhibition of transmission in reflex pathways. *The Journal of Physiology* 194:201-223.

Forssberg H, Grillner S (1973) The locomotion of the acute spinal cat injected with clonidine iv. *Brain Research* 50:184-186.

Forssberg H, Grillner S, Halbertsma J (1980a) The locomotion of the low spinal cat I. Coordination within a hindlimb. *Acta Physiologica Scandinavica* 108:269-281.

Forssberg H, Grillner S, Halbertsma J, Rossignol S (1980b) The locomotion of the low spinal cat. II. Interlimb coordination. *Acta Physiologica Scandinavica* 108:283-295.

Fouad K, Rank MM, Vavrek R, Murray KC, Sanelli L, Bennett DJ (2010) Locomotion After Spinal Cord Injury Depends on Constitutive Activity in Serotonin Receptors. *Journal of Neurophysiology* 104:2975-2984.

Freusberg A (1874) Reflexbewegungen beim Hunde. *Pflügers Arch* 9:359-391.

Fyda D, Vriend J, Jordan L (1997) Spinal release of monoamines associated with brainstem-electrically-evoked locomotion in the in vitro neonatal rat., vol. 23, p 2099 Society for Neuroscience Abstract.

Gandevia SC (2001) Spinal and Supraspinal Factors in Human Muscle Fatigue. *Physiological Reviews* 81:1725-1789.

Garraway SM, Hochman S (2001) Pharmacological characterization of serotonin receptor subtypes modulating primary afferent input to deep dorsal horn neurons in the neonatal rat. *British Journal of Pharmacology* 132:1789-1798.

Gerasimenko Y, Lu D, Modaber M, Zdunowski S, Gad P, Sayenko D, Morikawa E, Haakana P, Ferguson A, Roy R, VR. E (2015) Noninvasive Reactivation of Motor Descending Control after Paralysis. *Journal of Neurotrauma* 32:1968-1980.

Gharagozloo A, Holohean AM, Hackman JC, Davidoff RA (1990) Serotonin and GABA-induced depolarizations of frog primary afferent fibers. *Brain Research* 532:19-24.

Giroux N, Rossignol S, Reader TA (1999) Autoradiographic study of $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -noradrenergic and serotonin_{1A} receptors in the spinal cord of normal and chronically transected cats. *The Journal of Comparative Neurology* 406:402-414.

Goldberg MR, Robertson D (1983) Yohimbine: a pharmacological probe for study of the alpha 2-adrenoreceptor. *Pharmacological Reviews* 35:143-180.

Gonzalez H, Jiménez I, Rudomin P (1993) Reticulospinal actions on primary afferent depolarization of cutaneous and muscle afferents in the isolated frog neuraxis. *Experimental Brain Research* 95:261-270.

Gordon IT, Whelan PJ (2006a) Deciphering the organization and modulation of spinal locomotor central pattern generators. *Journal of Experimental Biology* 209:2007-2014.

Gordon IT, Whelan PJ (2006b) Monoaminergic Control of Cauda-Equina-Evoked Locomotion in the Neonatal Mouse Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology* 96:3122-3129.

Gosgnach S, Quevedo J, Fedirchuk B, McCrea DA (2000) Depression of group Ia monosynaptic EPSPs in cat hindlimb motoneurons during fictive locomotion. *The Journal of Physiology* 526:639-652.

Gossard JP, Brownstone RM, Barajon I, Hultborn H (1994) Transmission in a locomotor-related group Ib pathway from hindlimb extensor muscles in the cat. *Experimental Brain Research* 98:213-228.

Goulding M (2009) Circuits controlling vertebrate locomotion: moving in a new direction. *Nature Reviews Neuroscience* 10:507-518.

Grillner S (1985) Neurobiological bases of rhythmic motor acts in vertebrates. *Science* 228:143-149.

Grillner S, Shik ML (1973) On the Descending Control of the Lumbosacral Spinal Cord from the "Mesencephalic Locomotor Region". *Acta Physiologica Scandinavica* 87:320-333.

Grillner S, Zangger P (1979) On the central generation of locomotion in the low spinal cat. *Experimental Brain Research* 34:241-261.

Grunnet M, Jespersen T, Perrier J-F (2004) 5-HT 1A receptors modulate small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Journal of Neuroscience Research* 78:845-854.

Guertin P, Angel MJ, Perreault MC, McCrea DA (1995) Ankle extensor group I afferents excite extensors throughout the hindlimb during fictive locomotion in the cat. *The Journal of Physiology* 487:197-209.

Guignard B (2006) Kétamine, quelle place, quelles indications, quelles limites?: Elsevier Masson SAS.

Gurevich I, Englander MT, Adlersberg M, Siegal NB, Schmauss C (2002) Modulation of Serotonin 2C Receptor Editing by Sustained Changes in Serotonergic Neurotransmission. *The Journal of Neuroscience* 22:10529.

Hammar I, Chojnicka B, Jankowska E (2002) Modulation of responses of feline ventral spinocerebellar tract neurons by monoamines. *The Journal of Comparative Neurology* 443:298-309.

Hammond DL, Tyce GM, Yaksh TL (1985) Efflux of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline into spinal cord superfusates during stimulation of the rat medulla. *The Journal of Physiology* 359:151-162.

Han P, Nakanishi ST, Tran MA, Whelan PJ (2007) Dopaminergic Modulation of Spinal Neuronal Excitability. *The Journal of Neuroscience* 27:13192-13204.

Hara Y, Tamagawa M, Nakaya H (1994) The effects of ketamine on conduction velocity and maximum rate of rise of action potential upstroke in guinea pig papillary muscles: comparison with quinidine. *Anesthesia and Analgesia* 79:687-693.

Harrison PJ, Jankowska E (1985) Sources of input to interneurons mediating group I non-reciprocal inhibition of motoneurons in the cat. *The Journal of Physiology* 361:379-401.

Harvey PJ, Li X, Li Y, Bennett DJ (2006) 5-HT₂ Receptor Activation Facilitates a Persistent Sodium Current and Repetitive Firing in Spinal Motoneurons of Rats With and Without Chronic Spinal Cord Injury. *Journal of Neurophysiology* 96:1158-1170.

Hasegawa Y, Ono H (1996a) Effect of (+/-)-8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin hydrobromide on spinal motor systems in anesthetized intact and spinalized rats. *European journal of pharmacology* 295:211-214.

Hasegawa Y, Ono H (1996b) Effects of 8-OH-DPAT, a 5-HT_{1A} receptor agonist, and DOI, a 5-HT_{2A/2C} agonist, on monosynaptic transmission in spinalized rats. *Brain Research* 738:158-161.

Heckman CJ, Mottram C, Quinlan K, Theiss R, Schuster J (2009) Motoneuron excitability: The importance of neuromodulatory inputs. *Clinical Neurophysiology* 120:2040-2054.

Henn FA, Hamberger A (1971) Glial Cell Function: Uptake of Transmitter Substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68:2686-2690.

Hiebert GW, Pearson KG (1999) Contribution of Sensory Feedback to the Generation of Extensor Activity During Walking in the Decerebrate Cat. *Journal of Neurophysiology* 81:758-770.

Ho SM, Waite PME (2002) Effects of Different Anesthetics on the Paired-Pulse Depression of the H Reflex in Adult Rat. *Experimental Neurology* 177:494-502.

Hoffmann P (1910) beitrage zur kenntnis der menschlichen reflexe mit besonderer berücksichtigung der elektrischen erscheinungen. *Archiv für Anatomie und Physiologie* 1:223-246.

Honda M, Ono H (1999) Differential effects of (R)- and (S)-8-hydroxy-2-(di- n-propylamino)tetralin on the monosynaptic spinal reflex in rats. *European Journal of Pharmacology* 373:171-179.

Hongo T, Jankowska E, Lundberg A (1969) The rubrospinal tract. I. Effects on alpha-motoneurons innervating hindlimb muscles in cats. *Experimental Brain Research* 7:344-364.

Hongo T, Jankowska E, Lundberg A (1972a) The rubrospinal tract. III. Effects on primary afferent terminals. *Experimental Brain Research* 15:39-53.

Hongo T, Jankowska E, Lundberg A (1972b) The rubrospinal tract. IV. Effects on interneurons. *Experimental Brain Research* 15:54-78.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994) International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews* 46:157-203.

Hultborn H, Illert M, Nielsen J, Paul A, Ballegaard M, Wiese H (1996) On the mechanism of the post-activation depression of the H-reflex in human subjects. *Experimental Brain Research* 108:450-462.

Hultborn H, Jankowska E, Lindström S (1971) Recurrent inhibition of interneurons monosynaptically activated from group Ia afferents. *The Journal of Physiology* 215:613-636.

Hultborn H, Meunier S, Pierrot-Deseilligny E, Shindo M (1987) Changes in presynaptic inhibition of Ia fibres at the onset of voluntary contraction in man. *The Journal of Physiology* 389:757-772.

Illis LS (1967) the motor neuron surface and spinal shock. *Modern Trends in Neurology* 4:53-68.

Ito M, Udo M, Mano N (1970) Long inhibitory and excitatory pathways converging onto cat reticular and Deiters' neurons and their relevance to reticulofugal axons. *Journal of Neurophysiology* 33:210-226.

Jackson D, White S (1990) Receptor subtypes mediating facilitation by serotonin of excitability of spinal motoneurons. *Neuropharmacology* 29 787-797.

Jankowska E, Jukes M, Lund S, Lundberg A (1967) The effect of DOPA on the spinal cord 5. Reciprocal organization of pathways transmitting excitatory action to alpha motoneurons of flexors and extensors. *Acta physiologica Scandinavica* 70:369-388.

Jankowska E, McCrea D, Mackel R (1981) Pattern of 'non-reciprocal' inhibition of motoneurons by impulses in group Ia muscle spindle afferents in the cat. *The Journal of Physiology* 316:393-409.

Jeffrey-Gauthier R, Lefebvre B, Leblond H (2014) Acute and chronic effect of serotonergic neuromodulatory circuitry activation on locomotor recovery following dual spinal lesion paradigm in mice. SFN 44th annual meeting, Washington, DC, USA.

Jolivald CG, Lee CA, Ramos KM, Calcutt NA (2008) Allodynia and hyperalgesia in diabetic rats are mediated by GABA and depletion of spinal potassium-chloride co-transporters. *Pain* 140:48-57.

Jordan LM, Liu J, Hedlund PB, Akay T, Pearson KG (2008) Descending command systems for the initiation of locomotion in mammals. *Brain Research Reviews* 57(1):183-191.

Kakinohana O, Hefferan MP, Nakamura S, Kakinohana M, Galik J, Tomori Z, Marsala J, Yaksh TL, Marsala M (2006) Development of GABA-sensitive spasticity and rigidity in rats after transient spinal cord ischemia: A qualitative and quantitative electrophysiological and histopathological study. *Neuroscience* 141:1569-1583.

Kandel E, Schwartz J, Jessell T (2000) *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill, Health Professions Division.

Katz PS (2015) Evolution of central pattern generators and rhythmic behaviours. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371.

Kiehn O (2011) Development and functional organization of spinal locomotor circuits. *Current Opinion in Neurobiology* 21:100-109.

Kiehn O, Dougherty KJ, Hägglund M, Borgius L, Talpalar A, Restrepo CE (2010) Probing spinal circuits controlling walking in mammals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 396:11-18.

Kimelberg HK, Katz DM (1985) High-Affinity Uptake of Serotonin into Immunocytochemically Identified Astrocytes. *Science* 228:889-891.

Kjaerulff O, Kiehn O (1996) Distribution of networks generating and coordinating locomotor activity in the neonatal rat spinal cord in vitro: a lesion study. *Journal of Neuroscience* 16:5777-5794.

Kremer E, Lev-Tov A (1997) Localization of the Spinal Network Associated With Generation of Hindlimb Locomotion in the Neonatal Rat and Organization of Its Transverse Coupling System. *Journal of Neurophysiology* 77:1155-1170.

Krnjević K, Phillis JW (1963) Iontophoretic studies of neurones in the mammalian cerebral cortex. *The Journal of Physiology* 165:274-304.

Landry ES, Guertin PA (2004) Differential effects of 5-HT 1 and 5-HT 2 receptor agonists on hindlimb movements in paraplegic mice. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry* 28:1053-1060.

Laporte A, Doyen C, Nevo I, Chauveau J, Hauw J, Hamon M (1996) Autoradiographic mapping of serotonin 5-HT 1A, 5-HT 1D, 5-HT 2A and 5-HT 3 receptors in the aged human spinal cord. *Journal of chemical neuroanatomy* 11:67-75.

Leblond H (2000) Contrôle supraspinal du réseau locomoteur extensogène chez le chat. In: *Département de Physiologie, Faculté de Médecine, vol. Philosophiae Doctor (Ph-D.), p 257: Université de Montréal.*

Leblond H, Espérance M, Orsal D, Rossignol S (2003) Treadmill Locomotion in the Intact and Spinal Mouse. *The Journal of Neuroscience* 23:11411-11419.

Lee-Kubli CAG, Calcutt NA (2014) Altered rate-dependent depression of the spinal H-reflex as an indicator of spinal disinhibition in models of neuropathic pain. *Pain* 155:250-260.

Lee JK, Emch GS, Johnson CS, Wrathall JR (2005) Effect of spinal cord injury severity on alterations of the H-reflex. *Experimental Neurology* 196:430-440.

Lee S, Toda T, Kiyama H, Yamashita T (2014) Weakened rate-dependent depression of Hoffmann's reflex and increased motoneuron hyperactivity after motor cortical infarction in mice. *Cell Death & Disease* 5:e1007.

Leis AA, Kronenberg MF, Stětkárová I, Paske WC, Stokić DS (1996) Spinal motoneuron excitability after acute spinal cord injury in humans. *Neurology* 47:231-237.

Levkovitz Y, Segal M (1997) Serotonin 5-HT 1A receptors modulate hippocampal reactivity to afferent stimulation. *Journal of Neuroscience* 17:5591-5598

Li Y, Gorassini MA, Bennett DJ (2004) Role of Persistent Sodium and Calcium Currents in Motoneuron Firing and Spasticity in Chronic Spinal Rats. *Journal of Neurophysiology* 91:767-783.

Liu J, Jordan LM (2005) Stimulation of the Parapyramidal Region of the Neonatal Rat Brain Stem Produces Locomotor-Like Activity Involving Spinal 5-HT₇ and 5-HT_{2A} Receptors. *Journal of Neurophysiology* 94:1392-1404.

Lladó-Pelfort L, Santana N, Ghisi V, Artigas F, Celada P (2012) 5-HT_{1A} Receptor Agonists Enhance Pyramidal Cell Firing in Prefrontal Cortex Through a Preferential Action on GABA Interneurons. *Cerebral Cortex* 22:1487-1497.

Llewellyn-Smith IJ, Weaver LC (2001) Changes in synaptic inputs to sympathetic preganglionic neurons after spinal cord injury. *The Journal of Comparative Neurology* 435:226-240.

Loane C, Politis M (2012) Buspirone: What is it all about? *Brain Research* 1461:111-118.

Lundberg A, Malmgren K, Schomburg ED (1977) Cutaneous facilitation of transmission in reflex pathways from Ib afferents to motoneurons. *The Journal of Physiology* 265:763-780.

Lundberg A, Malmgren K, Schomburg ED (1978) Role of joint afferents in motor control exemplified by effects on reflex pathways from Ib afferents. *The Journal of Physiology* 284:327-343.

Lydic R (1989) Central pattern-generating neurons and the search for general principles. . *FASEB Journal* 3:2457-2468.

MacKay-Lyons M (2002) Central Pattern Generation of Locomotion: A Review of the Evidence. *Physical Therapy* 82:69-83.

Maclean JN, Cowley KC, Schmidt BJ (1998) NMDA Receptor-Mediated Oscillatory Activity in the Neonatal Rat Spinal Cord Is Serotonin Dependent. *Journal of Neurophysiology* 79:2804-2808.

Madriaga MA, McPhee LC, Chersa T, Christie KJ, Whelan PJ (2004) Modulation of Locomotor Activity by Multiple 5-HT and Dopaminergic Receptor Subtypes in the Neonatal Mouse Spinal Cord. *Journal of Neurophysiology* 92:1566-1576.

Magladery J, Porter W, Park A, Teasdall R (1951) Electrophysiological studies of nerve and reflex activity in normal man. IV. The two-neurone reflex and identification of certain action potentials from spinal roots and cord. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 88:499-519.

Matsuyama S, Nei K, Tanaka C (1997) Regulation of GABA release via NMDA and 5-HT_{1A} receptors in guinea pig dentate gyrus. *Brain Research* 761:105-112.

McCall RB, Aghajanian GK (1979) Serotonergic facilitation of facial motoneuron excitation. *Brain Research* 169:11-27.

McCrea DA (2001) Spinal circuitry of sensorimotor control of locomotion. *The Journal of Physiology* 533:41-50.

Meehan CF, Mayr KA, Manuel M, Nakanishi ST, Whelan PJ (2017) Decerebrate mouse model for studies of the spinal cord circuits. *Nature Protocols* 12:732-747.

Ménard A, Leblond H, Gossard J-P (2003) Modulation of monosynaptic transmission by presynaptic inhibition during fictive locomotion in the cat. *Brain Research* 964:67-82.

Meuser T, Pietruck C, Gabriel A, Xie G-X, Lim K-J, Pierce Palmer P (2002) 5-HT₇ receptors are involved in mediating 5-HT-induced activation of rat primary afferent neurons. *Life Sciences* 71:2279-2289.

Miller JF, Paul KD, Lee RH, Rymer WZ, Heckman CJ (1996) Restoration of extensor excitability in the acute spinal cat by the 5-HT₂ agonist DOI. *Journal of Neurophysiology* 75:620-628.

Misiaszek JE (2003) The H-reflex as a tool in neurophysiology: Its limitations and uses in understanding nervous system function. *Muscle & Nerve* 28:144-160.

Montague SJ, Fenrich KK, Mayer-Macaulay C, Maratta R, Neuber-Hess MS, Rose PK (2013) Nonuniform distribution of contacts from noradrenergic and serotonergic boutons on the dendrites of cat splenius motoneurons. *Journal of Comparative Neurology* 521:638-656.

Murray KC, Nakae A, Stephens MJ, Rank M, D'Amico J, Harvey PJ, Li X, Harris RLW, Ballou EW, Anelli R, Heckman CJ, Mashimo T, Vavrek R, Sanelli L, Gorassini MA, Bennett DJ, Fouad K (2010) Recovery of motoneuron and locomotor function after spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT_{2C} receptors. *Nature medicine* 16:694-700.

Murray KC, Stephens MJ, Ballou EW, Heckman CJ, Bennett DJ (2011) Motoneuron Excitability and Muscle Spasms Are Regulated by 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptor activity. *Journal of Neurophysiology* 105:731-748.

Nagano N, Ono H, Fukuda H (1988) Functional significance of subtypes of 5-HT receptors in the rat spinal reflex pathway. *General Pharmacology: The Vascular System* 19:789-793.

Nakamura Y, Katakura N (1995) Generation of masticatory rhythm in the brainstem. *Neuroscience Research* 23:1-19.

Nakanishi ST, Whelan PJ (2011) A decerebrate adult mouse model for examining the sensorimotor control of locomotion. *Journal of Neurophysiology* 107:500-515.

Nishikawa N, Bennett GJ, Ruda MA, Lu GW, Dubner R (1983) Immunocytochemical evidence for a serotonergic innervation of dorsal column postsynaptic neurons in cat and monkey: Light- and electron-microscopic observations. *Neuroscience* 10:1333-1340.

Noga B, Jankowska E, Skoog B (1995) Depression of transmission from group II muscle afferents by electrical stimulation of the cuneiform nucleus in the cat. *Experimental Brain Research* 105:25-38.

Noga BR, Johnson DMG, Riesgo MI, Pinzon A (2009) Locomotor-Activated Neurons of the Cat. I. Serotonergic Innervation and Co-Localization of 5-HT₇, 5-HT_{2a} and 5-HT_{1a} receptors in the thoraco-lumbar spinal cord. *Journal of Neurophysiology* 102:1560-1576.

Noga BR, Kriellaars DJ, Brownstone RM, Jordan LM (2003) Mechanism for Activation of Locomotor Centers in the Spinal Cord by Stimulation of the Mesencephalic Locomotor Region. *Journal of Neurophysiology* 90:1464-1478.

Noga BR, Pinzon A, Mesigil RP, Hentall ID (2004) Steady-State Levels of Monoamines in the Rat Lumbar Spinal Cord: Spatial Mapping and the Effect of Acute Spinal Cord Injury. *Journal of Neurophysiology* 92:567-577.

Otoshi CK, Walwyn WM, Tillakaratne NJK, Zhong H, Roy RR, Edgerton VR (2009) Distribution and Localization of 5-HT(1A) Receptors in the Rat Lumbar Spinal Cord after Transection and Deafferentation. *Journal of Neurotrauma* 26:575-584.

Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA (2004) The Hoffmann Reflex: Methodologic Considerations and Applications for Use in Sports Medicine and Athletic Training Research. *Journal of Athletic Training* 39:268-277.

Paxinos G, Franklin KB (2004) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*: Gulf Professional Publishing.

Penington NJ, Kelly JS (1990) Serotonin receptor activation reduces calcium current in an acutely dissociated adult central neuron. *Neuron* 4:751-758.

Perreault MC, Angel MJ, Guertin P, McCrea DA (1995) Effects of stimulation of hindlimb flexor group II afferents during fictive locomotion in the cat. *The Journal of Physiology* 487:211-220.

Perreault MC, Shefchyk SJ, Jimenez I, McCrea DA (1999) Depression of muscle and cutaneous afferent-evoked monosynaptic field potentials during fictive locomotion in the cat. *The Journal of Physiology* 521:691-703.

Perrier J-F, Alaburda A, Hounsgaard J (2003) 5-HT(1A) receptors increase excitability of spinal motoneurons by inhibiting a TASK-1-like K(+) current in the adult turtle. *The Journal of Physiology* 548:485-492.

Perrier J-F, Hounsgaard J (2003) 5-HT₂ Receptors Promote Plateau Potentials in Turtle Spinal Motoneurons by Facilitating an L-Type Calcium Current. *Journal of Neurophysiology* 89:954.

Perrier J-FM (2013) Encadrement de l'excitabilité des motoneurones par la sérotonine. *Medecine Sciences* 29:564-566.

Perrier J, Rasmussen H, Christensen R, Petersen A (2013) Modulation of the Intrinsic Properties of Motoneurons by Serotonin. *Current Pharmaceutical Design* 19:4371-4384.

Perrier JF, Cotel F (2008) Serotonin differentially modulates the intrinsic properties of spinal motoneurons from the adult turtle. *Journal of Physiology* 586:1233-1238.

Petersen AV, Cotel F, Perrier J-F (2016) Plasticity of the Axon Initial Segment: Fast and Slow Processes with Multiple Functional Roles. *The Neuroscientist*.

Philippson M (1905) L'autonomie et la centralisation dans le système nerveux des animaux. Bruxelles: Falk fils.

Pierce PA, Xie GX, Levine JD, Peroutka SJ (1996) 5-hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: A polymerase chain reaction study. *Neuroscience* 70:553-559.

Prochazka A, Gorassini M (1998) Ensemble firing of muscle afferents recorded during normal locomotion in cats. *The Journal of Physiology* 507:293-304.

Quevedo J, Fedirchuk B, Gosgnach S, McCrea DA (2000) Group I disynaptic excitation of cat hindlimb flexor and bifunctional motoneurons during fictive locomotion. *The Journal of Physiology* 525:549-564.

Roberts MHT, Straughan DW (1967) Excitation and depression of cortical neurones by 5-hydroxytryptamine. *The Journal of Physiology* 193:269-294.

Rodolfo D-L, Emanuel L-A, Carmen A, Justo A, Pierre AG, Ricardo F (2013) Extrasynaptic GABAA Receptors in the Brainstem and Spinal Cord: Structure and Function. *Current Pharmaceutical Design* 19:4485-4497.

Rossignol S (2006) Plasticity of connections underlying locomotor recovery after central and/or peripheral lesions in the adult mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361:1647-1671.

Rossignol S, Dubuc R, Gossard J-P (2005) Dynamic Sensorimotor Interactions in Locomotion. *Physiological Reviews* 86:89-154.

Rowell LB, Shepherd JT (1996) Exercise : regulation and integration of multiple systems: Published for the American Physiological Society by Oxford University Press.

Rudomin P (1990) Presynaptic inhibition of muscle spindle and tendon organ afferents in the mammalian spinal cord. *Trends in Neurosciences* 13:499-505.

Rudomin P, Quevedo J, Eguibar J (1993) Presynaptic modulation of spinal reflexes. *Current Opinion in Neurobiology* 3:997-1004.

Rudomin P, Schmidt R (1999) Presynaptic inhibition in the vertebrate spinal cord revisited. *Experimental Brain Research* 129:1-37.

Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F (2004) Expression of Serotonin1A and Serotonin2A Receptors in Pyramidal and GABAergic Neurons of the Rat Prefrontal Cortex. *Cerebral Cortex* 14:1100-1109.

Santini E, Porter JT (2010) M-type potassium channels modulate the intrinsic excitability of infralimbic neurons and regulate fear expression and extinction. *The Journal of Neuroscience* 30:12379-12386.

Schadt JC, Barnes CD (1980) Motoneuron membrane changes associated with spinal shock and the Schiff-Sherrington phenomenon. *Brain Research* 201:373-383.

Schieppati M (1987) The Hoffmann reflex: A means of assessing spinal reflex excitability and its descending control in man. *Progress in Neurobiology* 28:345-376.

Schindler-Ivens S, Shields RK (2000) Low frequency depression of H-reflexes in humans with acute and chronic spinal-cord injury. *Experimental Brain Research* 133:233-241.

Schmidt BJ, Jordan LM (2000) The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain Research Bulletin* 53:689-710.

Scholz A (2002) Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels. *British Journal of Anaesthesia* 89:52-61.

Schreiner L, Lindsley D, Magoun H (1949) Role of brain stem facilitatory systems in maintenance of spasticity. *Journal of Neurophysiology* 12:207-216.

Schwarz M, Block F, Pergande G (1994) N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated muscle relaxant action of flupirtine in rats. *Neuroreport* 5:1981-1984.

Seth P, Gajendiran M, Ganguly DK (1997) Desensitization of spinal 5-HT_{1A} receptors to 8-OH-DPAT: an in vivo spinal reflex study. *Neuroreport* 8:2489-2493.

Shapiro MG, Frazier SJ, Lester HA (2012) Unparalleled Control of Neural Activity Using Orthogonal Pharmacogenetics. *ACS Chemical Neuroscience* 3:619-629.

Sharples SA, Koblinger K, Humphreys JM, Whelan PJ (2014) Dopamine: a parallel pathway for the modulation of spinal locomotor networks. *Frontiers in Neural Circuits* 8:55.

Sherrington CS (1899) Address on the Spinal Animal. Medico-chirurgical transactions 82:449-478.

Sherrington CS (1910a) Flexion-reflex of the limb, crossed extension-reflex, and reflex stepping and standing. The Journal of Physiology 40:28-121.

Sherrington CS (1910b) Remarks on the reflex mechanism of the step. Brain 33:1-25.

Shik ML, Severin FV, Orlovskii GN (1966) [Control of walking and running by means of electric stimulation of the midbrain]. Biofizika 11:659-666.

Sibille E, Pavlides C, Benke D, Toth M (2000) Genetic inactivation of the serotonin_{1A} receptor in mice results in downregulation of major GABAA receptor α subunits, reduction of GABAA receptor binding, and benzodiazepine-resistant anxiety. The Journal of Neuroscience 20:2758-2765.

Sleigh J, Harvey M, Voss L, Denny B (2014) Ketamine – More mechanisms of action than just NMDA blockade. Trends in Anaesthesia and Critical Care 4:76-81.

Slivko É, Bogutskaya G (2008) Long-lasting inhibition of the soleus muscle H reflex related to realization of voluntary arm movements in humans. Neurophysiology 40:187-192.

Slivko EI, Teteryatnik EV (2005) Effects of Contralateral Afferent Stimulation on H Reflex in Humans. Neurophysiology 37:327-332.

Sorkin LS, McAdoo DJ, Willis WD (1993) Raphe magnus stimulation-induced antinociception in the cat is associated with release of amino acids as well as serotonin in the lumbar dorsal horn. Brain Research 618:95-108.

Stecina K, Quevedo J, McCrea DA (2005) Parallel reflex pathways from flexor muscle afferents evoking resetting and flexion enhancement during fictive locomotion and scratch in the cat. *The Journal of Physiology* 569:275-290.

Suzue T (1984) Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *The Journal of Physiology* 354:173-183.

Takahashi T, Berger AJ (1990) Direct excitation of rat spinal motoneurons by serotonin. *The Journal of Physiology* 423:63-76.

Takakusaki K, Chiba R, Nozu T, Okumura T (2016) Brainstem control of locomotion and muscle tone with special reference to the role of the mesopontine tegmentum and medullary reticulospinal systems. *Journal of Neural Transmission* 123(7):695-729.

Talley EM, Sadr NN, Bayliss DA (1997) Postnatal development of serotonergic innervation, 5-HT(1A)receptor expression, and 5-HT responses in rat motoneurons. *Journal of Neuroscience* 17:4473-4485.

Thilmann AF, Burke DJ, Rymer WZ (2012) *Spasticity: Mechanisms and management*: Springer Science & Business Media.

Thompson FJ, Reier PJ, Lucas CC, Parmer R (1992) Altered patterns of reflex excitability subsequent to contusion injury of the rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology* 68:1473-1486.

Ung R-V, Rouleau P, Guertin PA (2012) Functional and physiological effects of treadmill training induced by buspirone, carbidopa, and L-DOPA in clenbuterol-treated paraplegic mice. *Neurorehabilitation and neural repair* 26:385-394.

Viala D, Buser P (1969) The effects of DOPA and 5-HTP on rhythmic efferent discharges in hind limb nerves in the rabbit. *Brain Research* 12:437-443.

Viala D, Buser P (1971) Modalités d'obtention de rythmes locomoteurs chez le lapin spinal par traitements pharmacologiques (DOPA, 5-HTP,d-amphétamine). *Brain Research* 35:151-165.

Viala D, Buser P (1974) Effects of a decarboxylase inhibitor on the Dopa and 5-HTP induced changes in the locomotor-like discharge pattern of rabbit hind limb nerves. *Psychopharmacologia* 40:225-233.

Wang FC, Massart N, Kaux JF, Bouquiaux O (2011) L'onde F dans tous ses états. *Revue Neurologique* 167:938-944.

White SR, Neuman RS (1980) Facilitation of spinal motoneurone excitability by 5-hydroxytryptamine and noradrenaline. *Brain Research* 188:119-127.

Yang Y, Xiao J, Song W (2015) Post-activation depression of the lower extremities in stroke patients with spasticity and spastic equinovarus deformity. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 73:493-498.

Yomono HS, Suzuki H, Yoshioka K (1992) Serotonergic fibers induce a long-lasting inhibition of monosynaptic reflex in the neonatal rat spinal cord. *Neuroscience* 47:521-531.

Yoshimura M, Furue H (2006) Mechanisms for the Anti-nociceptive Actions of the Descending Noradrenergic and Serotonergic Systems in the Spinal Cord. *Journal of Pharmacological Sciences* 101:107-117.

Zhong G, Droho S, Crone S, Dietz S, Kwan AC, Webb WW, Sharma K, Harris-Warrick RM (2010) Electrophysiological characterization of the V2a interneurons and their locomotor-related activity in the neonatal mouse spinal cord. *The Journal of Neuroscience* 30:170-182.

Ziskind-Conhaim L, Seebach BS, Gao BX (1993) Changes in serotonin-induced potentials during spinal cord development. *Journal of Neurophysiology* 69:1338-1349.